

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C07K 16/40, C12P 21/08, G01N 33/53, A61K 39/395	A1	(11) 国際公開番号 WO00/18805 (43) 国際公開日 2000年4月6日(06.04.00)																												
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05350 (22) 国際出願日 1999年9月29日(29.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/291501 1998年9月29日(29.09.98) 特願平10/291503 1998年9月29日(29.09.98)	JP	(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特許(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書																												
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 協和開発工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (73) 発明者/出願人(米国についてのみ) 花井 伸雄(HANAI, Nobuo)[JP/JP] 〒229-0011 神奈川県相模原市大野台7-9-15 Kanagawa, (JP) 古谷 安希子(FURUYA, Akiko)[JP/JP] 〒194-0033 東京都町田市木曾町1464-49 Tokyo, (JP) (74) 代理人 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズビル3階 Tokyo, (JP)																														
<p>(54) Title: NOVEL ANTIBODIES, DRUGS CONTAINING THESE ANTIBODIES AND METHODS FOR SCREENING COMPOUNDS BY USING THESE ANTIBODIES</p> <p>(54) 発明の名称 新規抗体、該抗体を含有する医薬品及び該抗体を用いた化合物のスクリーニング方法</p> <p>(57) Abstract  An antibody recognizing a novel transmembrane matrix metalloprotease polypeptide [MT4-MMP(2)] which has a physiological activity different from MT4-MMP reported hitherto; preventives, diagnostics and remedies for various diseases such as arthrosis deformans, rheumatoid arthritis, asthma, autoimmune diseases and atopic dermatitis which contain the above antibody; a method for screening an MT4-MMP(2) inhibitor or activator by using the above antibody, etc. An antibody recognizing a novel human and mouse transmembrane matrix metalloprotease polypeptide MT5-MMP which has a physiological activity; preventives, diagnostics and remedies for various diseases such as arthrosis deformans, rheumatoid arthritis, asthma, autoimmune diseases, atopic dermatitis, brain failure such as cerebral stroke, and Alzheimer's disease which contain the above antibody; a method for screening an MT5-MMP inhibitor or activator by using the above antibody, etc.</p>																														
<table border="1"> <caption>Data extracted from the bar chart</caption> <thead> <tr> <th>Sample</th> <th>マウス MT4-MMP(2)</th> <th>ヒト MT4-MMP</th> <th>大鼠脳細胞蛋白質</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Kd2150</td> <td>~3.2</td> <td>~0.2</td> <td>~0.1</td> </tr> <tr> <td>Kd2151</td> <td>~3.2</td> <td>~0.1</td> <td>~0.1</td> </tr> <tr> <td>Kd2152</td> <td>~3.2</td> <td>~0.1</td> <td>~0.1</td> </tr> <tr> <td>Kd2153</td> <td>~3.2</td> <td>~0.8</td> <td>~0.1</td> </tr> <tr> <td>Kd2154</td> <td>~3.2</td> <td>~0.2</td> <td>~0.1</td> </tr> <tr> <td>Kd2155</td> <td>~3.2</td> <td>~0.8</td> <td>~0.1</td> </tr> </tbody> </table>			Sample	マウス MT4-MMP(2)	ヒト MT4-MMP	大鼠脳細胞蛋白質	Kd2150	~3.2	~0.2	~0.1	Kd2151	~3.2	~0.1	~0.1	Kd2152	~3.2	~0.1	~0.1	Kd2153	~3.2	~0.8	~0.1	Kd2154	~3.2	~0.2	~0.1	Kd2155	~3.2	~0.8	~0.1
Sample	マウス MT4-MMP(2)	ヒト MT4-MMP	大鼠脳細胞蛋白質																											
Kd2150	~3.2	~0.2	~0.1																											
Kd2151	~3.2	~0.1	~0.1																											
Kd2152	~3.2	~0.1	~0.1																											
Kd2153	~3.2	~0.8	~0.1																											
Kd2154	~3.2	~0.2	~0.1																											
Kd2155	~3.2	~0.8	~0.1																											

(57)要約

本発明は、従来報告されているMT 4-MMPとは異なり、生理的に活性を持った新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド(MT 4-MM P(2))を認識する抗体、該抗体を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎等の各種疾患の予防薬、診断薬および治療薬、および該抗体を用いたMT 4-MMP(2)の阻害薬や活性化薬のスクリーニング法等を提供する。

また、本発明の第2の課題は、生理的に活性を持ったヒトおよびマウスの新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼMT 5-MMPポリペプチドを認識する抗体、該抗体を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病等の各種疾患の予防薬、診断薬および治療薬、および該抗体を用いたMT 5-MMPの阻害薬や活性化薬のスクリーニング法等を提供することにある。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E アルバニア	DM ドミニカ	K Z カザフスタン	R U ロシア
A L アルバニア	DE デミトロニア	U C ウクライナ	S D S スーダン
A M アルメニア	E B エストニア	L I リヒテンシュタイン	S E G スウェーデン
A T エストニア	F I フィンランド	L K スリランカ	S G S シンガポール
A U エストニア	F R フランス	L R スペイン	S I K スコットランド
A Z エストニア	G A ギリシャ	L S レソト	S K S スペイン
H A ホンジュラス	G B 英国	L T ルクセンブルグ	S N H シナゴベ
B B バハマ	G C グアダ	L V ラトビア	S N S セネガル
B B E バハマ	G G O グルジア	M A モロッコ	S P Z スペイン
B B F バハマ	G G H ガーナ	M C モナコ	T D T チェコ
B B G ブルガリア	G G M ガンビア	M D モルドバ	T G T ドイツ
B J ブラジル	G G N ギニア	M G モルドバ	T J T ラトビア
B R ブラジル	G G W ギニア・ビサウ	M K モルドバニア(由ユーロ스타ヴィア)	T M T ハンガリース坦
B Y ベラルーシ	G R グリニ	并共和国	T R T ルコ
C A カナダ	H R クロアチア	M L マリ	T T T リトアニア・トバゴ
C C A カナダ	H U ハンガリー	M N モンゴル	U A U フィリピン
C C G コンゴ	I D インドネシア	M P モンテニギア	U A U フラム
C C H コンゴ	I D E アイルランド	M W モルト	U S U 美國
C C I コンゴ	I I E インドエニ	M X モンゴル	U S Z ウズベキスタン
C C M コンゴ	I N インド	N E E ニジニヌル	V N V ヴェトナム
C C N コンゴ	I S インドスランド	N L N ノーベルラン	Y J Y 中国
C C P コンゴ	I T イタリア	N O ノーベルラン	Z A Z アルゼンチン
C C Y コンゴ	J P 日本	P T ポーランド	Z W Z ジンバブエ
C C Z コンゴ	K E ケニア	RO ルーマニア	
D E K コンゴ	K G コーラ		
D E M コンゴ	K K コーラ		
D E K コンゴ	K P 北朝鮮		
D E K コンゴ	K R 韓国		

## 明 細 書

新規抗体、該抗体を含有する医薬品及び  
該抗体を用いた化合物のスクリーニング方法

## 技 術 分 野

本発明は、新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドと特異的に反応する抗体、該抗体を含有する医薬品、該抗体を用いた該ポリペプチドの発現を変動させる化合物または該ポリペプチドと結合する化合物のスクリーニング法に関する。

## 背 景 技 術

コラーゲン、フィプロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン等の複雑な成分から構成される細胞外マトリックスの分解には、金属イオンを活性中心に持つマトリックスメタロプロテアーゼと総称される一群の酵素（以下MMPsと略記する）が関与している。

これまでMMPsとしては、間質型コラゲナーゼ（MMP-1）、ゼラチナーゼA（MMP-2）、ゼラチナーゼB（MMP-9）、ストロメライシン1（MMP-3）、マトリライシン（MMP-7）、好中球コラゲナーゼ（MMP-8）、ストロメライシン2（MMP-10）、ストロメライシン3（MMP-11）、メタロエラスター（MMP-12）、コラゲナーゼ3（MMP-13）、膜貫通型MMP-1（MT1-MMPまたはMMP-14）、膜貫通型MMP-2（MT2-MMPまたはMMP-15）、膜貫通型MMP-3（MT3-MMPまたはMMP-16）、膜貫通型MMP-4（MT4-MMPまたはMMP-17）等が報告されている〔蛋白質核酸酵素、42, 2386(1997)〕。これらのMMPsはファミリーを形成し、各MMPは基本的にN-末端プロペプチドドメイン、亜鉛イオンが結合する活性ドメイン、ヘモベキシン凝血酵素様ドメインの3つから構成されている。MMP-7においてはヘモベキシン凝血酵素様ドメインはない。膜貫通型では、ヘモベキシン凝血酵素様ドメインのC-末端に膜貫通ドメインと、細胞内ドメインを持っている。

ヒトMT4-MMP遺伝子の報告は既にあるが [Puente: Cancer Research, 56, 944 (1996)]、該遺伝子の塩基配列には翻訳開始領域が含まれておらず、単にMMPに類似したドメイン領域を有する塩基配列を含んでいるとして定義された遺伝子である。従って、該遺伝子はMT4-MMP完全長をコードしているとは考えにくい。

一方、変形性関節症の患者においてMT1-MMPの産生が促進されていることや [Am. J. Pathol., 151, 245 (1997)]、免疫や炎症反応に重要な白血球の組織への浸潤にMMPが重要なことや [J. Immunol., 156, 1 (1996)]、MMP阻害薬が肝炎を予防すること [Eur. J. Pharmacol., 341, 105 (1998)]、MMP阻害薬が角膜潰瘍の治療 [日本眼科学会誌, 102, 270 (1998)] に有効であることが知られている。

また、癌の増殖、浸潤、転移にMMPが重要であることが知られており [蛋白質核酸酵素, 42, 2386 (1997)]、MMP阻害薬が制癌活性をもつことが報告されている [SCRIP, 2349, 20 (1998)]。

更に、MT4-MMPは白血球に発現して、白血球の遊走と浸潤に関係があることが示唆されている。

以上のことから、MMPは変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膀胱炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の悪性度を診断する指標となるとともに、その阻害薬はこれらの疾患の予防と治療に用いることができる。

既に報告されているMT4-MMP [Cancer Research, 56, 944 (1996)] は、転写開始点を含まず、従来知られているMT1-MMP等の膜貫通型MMPに見られるようなドメイン構造を持っていないため、生体内では発現していない非生理的なペプチドをコードした配列である。

本発明の第1の課題は、従来報告されているMT4-MMPとは異なり、生理的に活性を持った新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド

(以下、MT 4-MMP (2) と略すこともある) を認識する抗体、該抗体を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球浸潤に伴う炎症の予防薬、診断薬および治療薬、および該抗体を用いたMT 4-MMP (2) の阻害薬や活性化薬のスクリーニング法等を提供することにある。

また、本発明の第2の課題は、生理的に活性を持ったヒトおよびマウスの新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼMT 5-MMPポリペプチドを認識する抗体、該抗体を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の予防薬、診断薬および治療薬、および該抗体を用いたMT 5-MMPの阻害薬や活性化薬のスクリーニング法等を提供することにある。

### 発明の開示

本発明者らは、既知のヒトMT 4-MMPは本来の活性を有する蛋白質ではなく、活性を有する真のMT 4-MMPが存在するとの推測の基に鋭意検討を行い、新規な真のMT 4-MMP(以降MT 4-MMP (2) と記載する)を見いだし、該ポリペプチドを認識する抗体を取得することにより本発明を完成するに至った。

また、本発明者らは、医薬用途として有用と考えられている既知の膜貫通型MMP以外にも、有用な新規膜貫通型MMPが存在するとの推測の基に鋭意検討を行い、新規な真のMT 5-MMPを見いだし、該ポリペプチドを認識する抗体を取得することにより本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下(1)～(20)に関する。

- (1) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
- (2) 上記(1)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは

数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。

(3) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。

(4) 上記(3)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。

(5) 配列番号5記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。

(6) 上記(5)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。

(7) 配列番号6記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。

(8) 上記(7)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。

(9) 上記(1)から(8)のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

(10) 免疫学的検出法が、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法、放射性物質標識免疫抗体法、免疫組織化学染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法およびサンドイッチELISA法から選ばれる免疫学的検出法である、上記(9)記載の免疫学的検出法。

(11) 上記(1)から(8)のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドの免疫学的定量法。

(12) 免疫学的定量法が、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法、放射性物質標識免疫抗体法、免疫組織化学染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法およびサンドイッチELISA法から選ばれる免疫学的検出法である、上記(11)記載の免疫学的定量法。

(13) 上記(1)から(4)のいずれかに記載の抗体を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、

動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

(14) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(1)から(4)のいずれかに記載の抗体を用いて該ポリペプチド量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(15) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、上記(1)から(4)のいずれかに記載の抗体が該ポリペプチドに結合できる量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法。

(16) 上記(14)または(15)記載の方法で得られた化合物を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

(17) 上記(5)から(8)のいずれかに記載の抗体を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

(18) 上記(5)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(5)から(8)のいずれかに記載の抗体を用いて該ポリペプチド量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(19) 上記(5)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、上記(5)から(8)のいずれかに記載の抗体が該ポリペプチドに結合できる量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法。

(20) 上記(18)または(19)記載の方法で得られた化合物を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾痒、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体の反応特異性を示した図である。ELISA法により大腸菌発現マウスMT4-MMP(2)ヘモベキシン凝血酵素様ドメイン(図中マウスMT4-MMP(2))、大腸菌発現ヒトMT1-MMPヘモベキシン凝血酵素様ドメイン(図中ヒトMT1-MMP)及び大腸菌体蛋白質に対するKM2560～KM2565の反応特異性を調べた。

図2は、抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体の反応特異性を示した図である。ウエスタンブロッティングにより大腸菌発現マウスMT4-MMP(2)ヘモベキシン凝血酵素様ドメイン(図中マウスMT4-MMP)、大腸菌発現ヒトMT1-MMPヘモベキシン凝血酵素様ドメイン(図中ヒトMT1-MMP)及び大腸菌体蛋白に対するKM2560～KM2565及びウサギポリクローナル抗体(IgG画分)の反応特異性を調べた。

図3は、ヒトMT4-MMP(2)を発現したCOS-1細胞の免疫染色による検出を示した図である。免疫染色法により、ヒトMT4-MMP(2)遺伝子導入COS-1細胞に対する抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体(KM2561、KM2562)の反応性を調べた。ネガティブコントロール細胞として無処置COS-1細胞及びネガティブコントロール抗体としてKM1764(ラットIgG2a)を用いた。

図4は、蛍光抗体法によるヒトMT4-MMP(2)の検出を示した図である。蛍光抗体法により、ヒトMT4-MMP(2)遺伝子導入COS-1細胞に対する抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体(KM2561、KM2562)の反応性を調べた。ネガティブコントロール細胞として無処置COS-1細胞及びネガティブコントロール抗体としてKM1764(ラットIgG2a)を用いた。縦軸は細胞数、横軸(FL1-H)は蛍光強度、また点線はコントロール(KM1764添加)、実線はモノクローナル抗体(KM2561、KM2562)反応時のパターンを示す。

図5は、ウエスタンブロッティングによるヒトMT4-MMP(2)の検出を示した図である。100 µg/レーンのサンプル(細胞可溶化液)をSDS-PAGE(7.5%アクリルアミド)に処し、抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体KM2561を用いウエスタンブロッティングを行った。細胞(いずれもATCCから購入)はU937(ヒト網状肉腫(human histiocytic lymphoma))、THP-1(ヒト単球(human monocyte))、Jurkat(ヒト急性T細胞白血病(human acute T cell leukemia))を用いた。

図6は、ヒトMT5-MMPとマウスMT5-MMPのアミノ酸配列とヒトMT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMPならびにヒトMT4-MMP(2)のアミノ酸配列を比較した図である。

\*の部分は一致しているアミノ酸残基を示す。

.の部分は類似しているアミノ酸残基を示す。

(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)

ここで、kbはキロ塩基対(kilobase pairs)を表す。

図7は抗ヒトMT5-MMPポリクローナル抗体の反応特異性を示した図である。ELISA法により、免疫原である化合物1、2及び4に対するlot1及びlot2の反応性を調べた。コントロールとして免疫原とは別の化合物3、5を用いた。

図8は抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体の反応特異性を示した図である。

ELISA 法により、免疫原である化合物 5 に対する KM2645～KM2655 の反応性及び免疫原である化合物 3 に対する KM2656～KM2661 の反応性を調べた。一次抗体を添加せずに反応させた場合をコントロールとした。コントロール化合物として、KM2645～KM2655 の場合は化合物 5 を、KM2656～KM2661 の場合は化合物 3 を用いた。

図 9 はウエスタンプロッティングによるヒト MT5-MMP の検出結果を示した図である。COS-1 細胞可溶化液（図中 COS-1）、ヒト MT4-MMP（2）遺伝子導入 COS-1 細胞可溶化液（図中 MT4-MMP/COS-1）及びヒト MT5-MMP 遺伝子導入 COS-1 細胞可溶化液（図中 MT5-MMP/COS-1）を SDS-PAGE (7.5% アクリルアミド) に処した。抗ヒト MT5-MMP モノクローナル抗体 KM2655、KM2658、コントロールとして抗 FLAG モノクローナル抗体、抗 MT4-MMP モノクローナル抗体 KM2561、マウス IgG1、ラット IgG1 を用いウエスタンプロッティングを行った。

図 10 は蛍光抗体法によるヒト MT5-MMP の検出結果を示した図である。蛍光抗体法により、ヒト MT5-MMP 遺伝子導入 COS-1 細胞（図中 MT5-MMP/COS-1）及び無処置 COS-1 細胞に対する抗ヒト MT5-MMP モノクローナル抗体（化合物 3 より得られた KM2648 及び KM2652）の反応性を調べた。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。コントロール抗体として抗 FLAG モノクローナル抗体及び MT5-MMP に反応しないモノクローナル抗体（抗 G-CSF 誘導体モノクローナル抗体 KM511）を用いた。

図 11 は蛍光抗体法によるヒト MT5-MMP の検出結果を示した図である。蛍光抗体法により、ヒト MT5-MMP 遺伝子導入 COS-1 細胞（図中 MT5-MMP/COS-1）及び無処置 COS-1 細胞に対する抗ヒト MT5-MMP モノクローナル抗体（化合物 3 より得られた KM2653、KM2654 及び KM2655）の反応性を調べた。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

図12は蛍光抗体法によるヒトMT5-MMPの検出結果を示した図である。蛍光抗体法により、ヒトMT5-MMP遺伝子導入COS-1細胞（図中MT5-MMP/COS-1）及び無処置COS-1細胞に対する抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体（化合物5より得られたKM2658）の反応性を調べた。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。コントロール抗体として、MT5-MMPに反応しないモノクローナル抗体（抗G-CSF誘導体モノクローナル抗体KM511）を用いた。

#### 発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

[1] 新規マトリックスメタロプロテアーゼMT4-MMP（2）及びMT5-MMP（以下、別に明示しない限り、本発明のポリペプチドという）をコードするDNAの取得

##### (1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジンートリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム(AGPC)法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

全RNAからポリ(A)+RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); 以下、モレキュラークローニング 第2版と略す) やオリゴdTラテックスを用いる方法 (細胞光学 別冊8「新細胞光学実験プロトコール」秀潤社48-52頁、Nucleic Acids Res., Symposium Series, 19, 61(1988)) 等を用いることができる。

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジエン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

MT 4 - MMP (2) の場合には、適切な細胞または組織として、データベースから見出された MT 4 - MMP をコードする DNA の EST 等が含まれていた cDNA ライブラーの種類を調べ、該ライブラーを構築するために用いた細胞または組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

また、MT 5 - MMP の場合には、適切な細胞または組織として、脳や腎臓などの組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

得られた全 RNA あるいは mRNA を用い、常法により cDNA ライブラーを作製する。

cDNA ライブラー作製法として、モレキュラー クローニング 第2版や Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下カレント プロトコールズ イン モレキュラー バイオロジーと略す)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスープラスクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコ BRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA ・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit, ストラタジーン社製] を用いる方法等をあげることができる。

cDNA ライブラーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K 12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10, λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 (Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983))、pUC 18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名 pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)] 等をあげることができる。

宿主微生物としては、大腸菌Escherichia coliに属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XLI-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、Escherichia coli LE392(モレキュラー クローニング 第2版)等を用いることができる。

上記方法により作製したcDNAライブラリーに加え、市販のcDNAライブラリーも利用することができる。

市販のcDNAライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器cDNAライブラリーをあげることができる。

#### (2) 本発明のポリペプチドをコードするDNAの取得

上記(1)で作製したcDNAライブラリーより、本発明のDNAを有するcDNAクローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブラーク・ハイブリダイゼーション法(モレキュラー クローニング 第2版)等により選択することができる。

プローブとしては、MT4-MMP(2)の場合には、一部明らかになっているMT4-MMPをコードするDNAの塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができます。また、MT5-MMPの場合には、MT3-MMPをコードするDNAの塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができます。

上記方法により得られた、目的とするクローンより、上述の方法でmRNAを取得し、cDNAを合成する。

該cDNAの両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE(rapid amplification of cDNA ends)および3'-RACE(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85,

8998 (1988))により、プライマーに用いた配列よりも5'端側および3'端側のcDNA断片を得ることができる。

得られたcDNA断片をつなぎあわせることにより全長のcDNAを取得することができる。

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジテオキシン法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]あるいはパーキン・エルマー社(Perkin Elmer : 373A・DNAシーケンサー)、ファルマシア社、ライコア(LI-COR)社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子の塩基配列を決定するためには、通常の染色体DNAクローニング法を用いることができる(モレキュラークローニング 第2版)。

即ち、本発明のポリペプチドを発現している細胞、すなわち、MT4-MMP(2)の場合には、例えばモノサイト系のTHP-1細胞等、MT5-MMPの場合には、例えば脳や腎臓等、の染色体DNAを制限酵素で消化し、該切断断片を通常のプラスミドベクターまたはファージベクターを用いてクローニングし、ゲノムライブラリーを作製する。

上記において取得され、塩基配列の決定されたDNA断片をプローブとして用い、上記のcDNAクローニングで用いた方法と同様の方法で該ゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子を有するクローニングを取得することができる。

該クローニングを用いて、上述の方法によりゲノム遺伝子の塩基配列を決定することができる。

また、上記方法で取得したDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とするDNAを取得することができる。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、

チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したバーキン・エルマー社製のDNA合成機model 3.9.2等をあげることができる。

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ(FrameSearch)などの相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Protなどのアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

該方法により確認された新規な塩基配列を有するMT4-MMP(2)をコードするDNAとして、例えば、配列番号3または配列番号4で表される配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号3で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはpmMT4/pBSSKを、配列番号4で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはphMT4/pBSIIKSをあげることができる。

プラスミドpmMT4/pBSSKを含有する大腸菌 Escherichia coli pmMT4/pBSSKは、F E R M B P - 6 5 2 8 として、プラスミドphMT4/pBSIIKSを含有する大腸菌 Escherichia coli phMT4/pBSIIKSは、F E R M B P - 6 5 3 0 として平成10年9月25日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)に寄託されている。

また、上記方法により確認された新規な塩基配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAとして、例えば、配列番号7または配列番号8で表される配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号7で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはpmMT5/pBSSKを、配列番号8で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはphMT5/pGEMをあげることができる。

プラスミドpmMT5/pBSSKを含有する大腸菌 Escherichia coli pmMT5/pBSSKは、F E R M B P - 6 5 2 9 として、プラスミドphMT5/pGEMを含有する大腸菌 Escherichia coli phMT5/pGEMは、F E R M B P - 6 5 3 1 として平成10年9

月25日付で工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1  
丁目1番3号（郵便番号305-8566）に寄託されている。

## [2] マトリックスメタロプロテーゼポリペプチドの調製

### (1) 形質転換体の作製

上記[1]に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドをコードするD  
NA（以下本発明のDNAという）を宿主細胞内で発現させるためには、モレキ  
ュラークローニング 第2版やカレントプロトコールズ イン モレキュラー  
バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

即ち、該DNAを適当な発現ベクターのプロモータ下流に挿入した組換えベ  
クターを作成し、それを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチド  
を発現する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子を  
発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中  
への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有して  
いるものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチド遺伝  
子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リ  
ボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列より構成された組換えベクタ  
ーであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pKK233-2（アルマシア社製）、pSE280（イン  
ビトロジエン社製）、pGEMEX-1（プロメガ（Promega）社製）、pQE-8（キアゲン（QIAGEN）  
社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200（Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)）、  
pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pGEX（フ  
ルマシア社製）、pET-3（ノバジェン社製）等をあげることができる。

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであ  
ればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター (P<sub>trp</sub>)、lac プロモータ

一、PL プロモーター、PR プロモーター、T7 プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01 プロモーター、SP02 プロモーター、*penP* プロモーター等をあげることができる。また *Ptrp* を 2 つ直列させたプロモーター (*Ptrp* × 2)、*tac* プロモーター、*lacT7* プロモーター、*let I* プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リポソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6 ~ 18 塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明の DNA の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシエリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、*Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* No. 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium immariophilum* ATCC14068, *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Microbacterium ammoniphilum* ATCC15354, *Pseudomonas* sp. D-0110 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)), プロトプラスト法 (特開昭 63-248394), エレクトロポレーション法 (Gene, 17, 107 (1982), Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)) 等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15 等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MFA1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスボロン属、シワニオミセス属、ビヒア等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、

Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984))、酢酸リチウム法 (Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)) 等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE107 (特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990))、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 (Nature, 329, 840 (1987))、pcDNA1/Amp (インビトロジエン社製)、pREP4 (インビトロジエン社製)、pAGE103 (Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)) 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRαプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、HEK293 細胞 (ATCC: CRL-1573)、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リボフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987), Virology, 52, 456 (1973)] 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば *Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、カレント・プロトコルズ 1～38、*Bio Technology*, 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジエン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual* (1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である High 5 (インビトロジエン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リボフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー クローニング 第

2 版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

## (2) 形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーブリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中p

pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6～8、30～40°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で 1～7 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 [ファーミングエン (Pharmingen) 社製]、SF-900 [SFM 培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell1400、ExCell1405 (いずれも JRH バイオサイエンシーズ (JRH Biosciences) 社製)、Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788 (1962))] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6～7、25～30°C 等の条件下で 1～5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

### (3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させた本発明のポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん渦後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、Q-セファロース、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75(三菱化学社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティーコロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞上に発現された場合には、培養細胞の膜画

分を界面活性化剤で溶解して可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（*t*-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスト・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

### [3] 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

#### (1) 抗原用部分ペプチドの調製

本発明のポリペプチドをコードする cDNA を含む発現ベクターを上記 [2] に記載の方法により大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入してリコンビナント蛋白質を得る。ヒト MT 5-MMP 蛋白質の場合には、ヒト腫瘍培養細胞等から精製することもできる。また、ヒト MT 4-MMP (2) あるいはヒト MT 5-MMP 蛋白質の部分配列を有するペプチドをペプチド合成により得る。

抗原用部分ペプチドとしては、5~30 残基程度の蛋白質部分配列が選択される。変性していない天然の構造を有している状態の蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上蛋白質の表面に存在している部分配列を抗原ペプチドとして選択する必要がある。立体構造上蛋白質表面に存在する部分は、Kyte と Doolittle の方法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 157, 105-132 (1982)] などにより、親水性の高い部分配列を予測することで推測することができる。

即ち、一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多い。また、蛋白質の N 末端、C 末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。しかしながら、このように選択した部分ペプチドが目的通りの抗体を作製するための抗原となるとは限らない。部分ペプチドには蛋白質と架橋するために、システインを末端に付加する。蛋

白質の内部配列を選択した場合には、必要に応じペプチドの N 末端はアセチル化、 C 末端はアミド化する。

部分ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる〔ザ・ペプタイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第 1 卷 (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1)、エアハルト・グロス (Erhard Gross) およびヨハン・マインホッファー (Johannes Meinhofer) 編、アカデミック・プレス (Academic Press)、1979 年、第 2 卷 1980 年、第 3 卷 1981 年; ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985 年; 続医薬品の開発、第 14 卷、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991 年; インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ (International Journal of Peptide Protein Research)、35, 161 (1990)〕。

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、アプライド・バイオシステム社製 (Applied Biosystems, Inc., USA、以後 ABI 社と略称する) ペプチド合成機、アドバンスト・ケムテック社製 (Advanced ChemTech Inc., USA、以後 ACT 社と略称する) ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した  $N^{\alpha}$ -Fmoc-アミノ酸あるいは  $N^{\alpha}$ -Boc-アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。

部分ペプチドの原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI 社、島津製作所、国産化学 (株)、ノバ・バイオケム社 (Nova Biochem)、渡辺化学 (株)、ACT 社、またはペプチド研究所 (株) アナスペック社 (Ana Spec) 等から入手することができる。また、部分ペプチドの原料となる保護アミノ酸、保護有機酸、保護有機アミンは報告されている合成法に従って、あるいはそれに準じて合成することができる〔ザ・ペプタイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第 1 卷 (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1)、エアハルト・グロス (Erhard Gross) およびヨハン・マインホッファー (Johannes Meinhofer) 編、アカデミック・プレス (Academic Press)、1979 年、第 2 卷 1980 年、第 3 卷 1981 年; ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985 年; 続医薬品の開発、第 14

業、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991年；インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ (International Journal of Peptide Protein Research)、35、161 (1990)】。

なお、該部分ペプチドの理化学的性質は以下の機器により測定できる。  
質量分析は日本電子社製 JMS-HX110Aを用いFAB法により測定する。  
アミノ酸分析は Bidlingmeyer, B.A.等[ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (Journal of Chromatography)、336巻、93頁(1984年)]の方法を用いる。  
加水分解は塩酸蒸気中 110°Cで 22 時間行う。加水分解物のアミノ酸組成は Waters Accq Tag アミノ酸分析計で分析する。

## (2) ポリクローナル抗体の調製

上記 [2] あるいは [3] (1) に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長、部分ペプチド精製標品、または上記 [3] (1) に記載の方法により取得した部分ペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物 1匹当たり 50～100 μg が好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。

該抗原の投与は、1回目の投与の後 1～2 週間おきに 3～10 回行う。各投与後、3～7 日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法(酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988) 等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、該血清が充分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

抗体を分離、精製する方法としては、連心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カブリル酸沈殿 [Antibodies. A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル通過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

### (3) モノクローナル抗体の調製

#### (3-1) 抗体産生細胞の調製

上記(2)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラット、マウス、ハムスター等を抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラット、マウス、ハムスター等に抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出す。

該脾臓をMEM培地(日本製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH 7.65)で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

#### (3-2) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)]等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地[RPMI-1640培地にグルタミン(1.5mmol/L)、2-メルカプトエタノール(5×10<sup>-5</sup>M)、ゲンタマイシン(10μg/mL)および牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地(以下、正常培地という)]に、

さらに8-アザグアニン(1.5 μg/mL)を加えた培地)で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を $2 \times 10^7$ 個以上用いる。

### (3-3)ハイブリドーマの作製

(3-1)で取得した抗体産生細胞と(3-2)で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨髄腫細胞=5~10:1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、搅拌しながら、37°Cで、10%抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)2g、MEM 2mLおよびジメチルスルホキシド(DMSO)0.7mLを混合した溶液を0.2~1mL添加し、更に1~2分間毎にMEM培地1~2mLを数回添加する。

添加後、MEM培地を加えて全量が50mLになるように調製する。

該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスビペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地(正常培地にヒボキサンチン( $10^{-4}$ mM/L)、チミジン( $1.5 \times 10^{-5}$ mM/L)およびアミノブテリン( $4 \times 10^{-7}$ mM/L)を加えた培地)100mL中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100μL/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>イシキュベーター中、37°Cで7~14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとリアンチボディイズ(Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter14 (1988))等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的な例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品

を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(3-4)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリベブチドに特異的に反応するものを本発明のポリベブチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釀法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地(HAT培地からアミノブテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリベブチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

#### (3-4) モノクローナル抗体の調製

ブリストン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルベンタデカン(Pristane)0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(3-3)で取得した本発明のポリベブチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞5~20×10<sup>6</sup>細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。また、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株の培養上清中からも同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のクラスおよびサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキット等を用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

なお、抗体のクラスとは抗体のアイソタイプのことでヒトでは、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE があげられる。サブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことである。マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4

があげられる。

#### [ 4 ] 本発明の抗体の利用

##### ( 1 ) 本発明の抗体を用いた、本発明のポリペプチドの免疫学的検出および定量

本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを以下の方法により免疫学的に検出および定量することができる。

該方法として、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法（ELISA）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC法、CSA法等）、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチELISA法〔単クローラン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック、1987年）、続生化学実験講座5 免疫生化学研究法（東京化学同人、1986年）〕等をあげることができる。

蛍光抗体法とは、分離した、細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにフルオレシン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

免疫酵素抗体法（ELISA）とは、分離した、細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法（RIA）とは、分離した細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、分離した細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明

の抗体を反応させ、さらにフルオレシン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

(2) 本発明の抗体を用いた本発明のポリペプチドの発現を調節する化合物（以下、発現調節化合物と略す）の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明のポリペプチドを認識する抗体を用いることにより、その細胞中、細胞培養上清中に存在する本発明のポリペプチドの発現調節化合物を探査、同定することができる。

細胞としては、本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチド mRNA を発現している細胞、細胞株、組織、または、下記に記載した抗体により免疫学的に検出する方法を用いて該ポリペプチドの発現が認められた、細胞、細胞株あるいは組織ならいかなるものでも用いることができる。

該ポリペプチド mRNA は、通常のノーザンハイブリダイゼーション法、RNA のドットプロットハイブリダイゼーション法、RT-PCR 法などを用い検出する。

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよび RT-PCR 法等に用いることのできるプライマーとして、MT4-MMP (2) の場合には、本発明の MT4-MMP (2) 遺伝子断片をあげることができ、具体的には配列番号 3 または配列番号 4 記載の DNA 配列から選ばれる配列を有する DNA 断片を好適に用いることができる。好適な細胞株として例えば、ヒト単球株 THP-1(ATCC TIB-202) をあげることができる。

一方、MT5-MMP の場合には、ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよび RT-PCR 法等に用いることのできるプライマーとして、本発明の MT5-MMP 遺伝子断片をあげることができ、具体的には配列番号 7 または配列番号 8 記載の DNA 配列から選ばれる配列を有する DNA 断片を好適に用いることができる。好適な細胞株として例えば、ヒト線維芽細胞腫株 (HT-1080)、神経芽細胞腫 (SK-N-SH)、未分化型グリオーマ (no. 10)、グリオーマ (KALS-1)、胰臓癌 (PANC-1, MIA PaCa-2)、肝癌 (SK-HEP-1, Hep 3B) をあげ

ることができる。

本発明のポリペプチドを発現する細胞を、例えば該細胞が増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞が発現したポリペプチド含量を、上記〔3〕記載の抗体を用い、下記の方法に準じて定量する。

免疫染色を行う細胞を免疫細胞染色用緩衝液（1% BSA、0.02% EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS）等に懸濁し、 $1 \sim 20 \times 10^6$  個ずつ丸底96穴プレートに分注する。

該プレートに、〔3〕で取得した本発明のポリペプチドに対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清、〔3〕で取得した本発明のポリペプチドに対する精製モノクローナル抗体、もしくは該モノクローナル抗体を公知の方法（酵素抗体法：学際企画刊 1985年）でビオチン標識した抗体を $0.1 \sim 5.0 \mu\text{g/mL}$  の濃度になるように免疫細胞染色用緩衝液あるいは $10\%$ 動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて希釈したもの $20 \sim 500 \mu\text{L}/\text{穴}$ となるように分注し、氷冷下で30分間放置する。

上記において、〔3〕で取得した本発明のポリペプチドに対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清または〔3〕で取得した本発明のポリペプチドに対する精製モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を洗浄後、FITCあるいはフィヨエリスリン等の蛍光色素で標識した抗イムノグロブリン抗体を $0.1 \sim 5.0 \mu\text{g/mL}$ 程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を $50 \sim 500 \mu\text{L}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートにFITCあるいはフィヨエリスリン等の蛍光色素で標識したストレプトアビシンを $50 \sim 500 \mu\text{L}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を良く洗浄し、蛍光顕微鏡、セルソーター等により解析する。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物(例え

ばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等)の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

被験試料としてペプチドを用いる場合、ランダムペプチドライブラーを利用することができる。ランダムペプチドライブラーとしては、ファージ上のペプチドシステム (peptides on phage) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6378 (1990); PCT 特許出願番号 96/40189]、プラスミド上のペプチドシステム (peptides on plasmids) (米国出願特許番号 5,270,170; 米国出願特許番号 5,338,665) があげられる。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

#### (3) 本発明のポリペプチドの阻害薬または活性化薬の探索および同定

上記 [2] に記載の方法で調製した本発明の精製ポリペプチドをコーティングしたプレートに被験試料を添加した後、該プレートに上記 [3] に記載の方法で調製した本発明の抗体を添加する。

該抗体の本発明のポリペプチドへの結合に対する被験試料の影響を ELISA 法や RIA 法などで比較することにより、被験試料の中から本発明のポリペプチドに結合する物質をスクリーニングすることができる。

該スクリーニングにより得られる化合物には、プロテアーゼの活性を阻害する化合物(阻害薬)、および、プロテアーゼの活性を増強する活性を有する化合物(活性化薬)が含まれる。

被験試料としては、上記 (2) であげたものを用いることができる。

(4) 本発明の抗体を用い、健常者および被験者の細胞または組織に存在する本発明のポリペプチドを上記 (1) 記載の方法により免疫学的に検出または定量し、その量を健常者と被験者とで比較し、発現量の変化を調べることにより、MT4-MMP (2) に対する抗体の場合には、被験者の変形性関節症、慢性関節リウ

マチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、虚血性心疾患、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの病態の診断に用いることができる。また、MT 5-MMPに対する抗体の場合には、被験者の変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、虚血性心疾患、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの病態の診断に用いることができる。

(5) 本発明のポリペプチドの機能（プロテアーゼ活性）を阻害する抗体を投与することにより、MT 4-MMP (2)に対する抗体の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療または予防が期待される。また、MT 5-MMPに対する抗体の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療または予防が期待される。

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として該抗体単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として用いることが望ましい。

該治療薬の投与方法としては、治療に際し最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、テープ剤等をあげることができる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、

顆粒剤等をあげることができる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンブン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用い製造することができる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製することができる。

座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製することができる。

噴霧剤は、本発明の抗体をそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製した噴霧剤が好ましい。

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

本発明の抗体および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することが可能である。

これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\text{ }\mu\text{g}/\text{k g}$ ～ $8\text{ mg}/\text{k g}$ である。

## [ 5 ] 発現調節化合物の利用

上記〔4〕(2)で取得される発現調節化合物は、MT4-MMP(2)に対する抗体を用いて得られる化合物の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療または予防などが期待される。また、MT5-MMPに対する抗体を用いて得られる化合物の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療または予防などが期待される。該発現調節化合物を含有する医薬は、上記〔4〕の本発明の抗体の医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて医薬製剤として調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔4〕の場合と同様の方法で投与することができる。

### 実 施 例

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

#### 実施例1 マウスMT4-MMP関連蛋白(MT4-MMP(2))遺伝子のクローニング

MT4-MMP遺伝子はヒトの脳で高発現していることから、マウス17日胚の脳cDNAライブラリーをZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene)を用い、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

ヒトMT4-MMP遺伝子の部分配列(配列番号17の233-1899)をプローブとして用い、上記cDNAライブラリーのスクリーニングをブラークハイブリダイゼーション法により行った。

該スクリーニングにより上記プローブをハイブリダイズする陽性クローンの数種について塩基配列を解析した。解析したクローンは全て報告されたヒトMT4-MMP遺伝子において欠落していると思われるシグナルペプチド配列部分を含

んでおり、最長のクローンは3.5 kbであった。従って、マウスでは587アミノ酸の配列番号1に記載したMT4-MMP(2)を発現できる配列番号3に記載したDNAに対応するmRNAが発現していると考えられた。

#### 実施例2 ヒトMT4-MMP(2)遺伝子のクローニング

ヒトMT4-MMP遺伝子に関するESTクローンをデータベースで調べたが、上記マウスで見られたようなシグナルペプチドをコードする部分を含むクローンの登録はなかった。従って、ヒトMT4-MMP遺伝子において分泌型のヒトMT4-MMP遺伝子は存在しないか、あるいは単離するには困難な理由があると思われた。

実施例1で取得したマウスMT4-MMP(2)遺伝子のシグナルペプチドに相当するN末端の部分をコードする配列をプローブとしてヒト脳cDNAライブラリー(クロンテック社製)をスクリーニングしたが、相当する遺伝子の単離はできなかった。そこで5'RACE法にて転写産物の5'領域の解析を行った。細胞はMT4-MMP mRNAの発現が確認された単核球由来のTHP-1(ATCC TIB-202、American Type Culture Collection)細胞を用いた。

即ち、ヒトTHP-1細胞から単離したpoly(A)+RNAとヒトMT4-MMP選択的なプライマー(配列番号9)を使用してsuperscript II(ギブコBRL社製)でcDNAを作成した。得られたcDNAに単一鎖のオリゴヌクレオチドアダプター(配列番号10)をT4 RNAリガーゼでつなぎ、MT4-MMP選択的なプライマー(配列番号9)とアダプター選択的なプライマー(配列番号11)でGC緩衝液とLA Taq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCR後、遺伝子選択的な他のプライマー(配列番号12)とアダプター選択的なプライマー(配列番号13)を用いてPCRを行った。

50個のクローンを解析した結果、3個はMT4-MMPの配列を含むcDNA断片であったが、47個はマウスMT4-MMP(2)に類似するシグナルペプチド配列をコードするcDNA断片であった。このことにより、既に明らかになっているプロペプチド配列の下流部分に加えて、シグナルペプチドを含む配列番号2に示すヒトMT4-MMP(2)をコードする配列番号4に示すmRNA

の全量域が明らかとなった。ESTクローニングのH97792クローニングの遺伝子配列はPuenteにより報告されたMT4-MMP(Cancer Research, 56, 944 (1996))とほとんど同一であったが、catalytic domainの配列の一部が異なっており、ESTクローニングH97792の方がマウスマト4-MMP(2)との保存性が高かった。全配列を新たに決定したところ、Puenteにより報告されたMT4-MMP(Cancer Research, 56, 944 (1996))の既に明らかになっている部分においても、MT4-MMP(2)は配列の異なる部分が見られた。

マウスおよびヒトMT4-MMP(2)は相互によく保存されており、プロペチド、触媒、ヒンジ、ヘモベキシン凝血酵素様ドメインの各ドメインはそれぞれ87、87、78、96%のホモロジーを有していた。シグナルペプチドと膜貫通部位比較的類似性が低く54と35%であった。また、触媒ドメインのヒトMT4-MMP(2)とMT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMPの間との比較は、それぞれ、36、39、31%であった。このことからも、マウスマト4-MMP(2)はヒトMT4-MMP(2)に最も近く、ヒトMT4-MMP(2)のマウスホモログであると結論された。

#### 実施例3 MT4-MMP(2)の発現と遺伝子産物の検出

単離したcDNAから確かに遺伝子産物が翻訳されることを確認するために、cDNAをSV40プロモーターを持つpSG5ベクター(ストラタジーン社製)に組み込んだ。発現した産物の検出のために、潜在型酵素のプロセッシング部位の下流にFLAG配列(イーストマンケミカル社製)を組み込むことにより、抗FLAG抗体による検出を可能とした。

COS-1細胞にマウスおよびヒトのMT4-MMP(2)の発現プラスミドをトランスフェクションし、48時間後に採取した細胞を溶解して、ウエスタン法によってFLAG標識MT4-MMP(2)の検出を行った。抗FLAG抗体M2(イーストマンケミカル社製)によってともに、発現プラスミドをトランスフェクションした細胞に特異的な66kDaのバンドが検出された。

#### 実施例4 MT4-MMPの転写産物の検出および解析

MT 4 - MMP 転写産物は 5' 端に Alu 配列を持つことから、イントロンを含んでいる可能性があったため、ヒト MT 4 - MMP (2) 遺伝子の部分配列（配列番号 4 の 212 - 519）をプローブとして用い、ヒューマンサイエンス研究資源バンクのライブラリー（Deposit >No. L1020）よりハイブリダイゼーション法により、ハイブリダイズするクローンを単離して、該クローンよりプラスミドを常法により抽出し、該プラスミドに含有される MT 4 - MMP の 5' 末端付近の塩基配列（配列番号 17 の 140 ~ 272 番）の周辺の遺伝子配列を調べた。

MT 4 - MMP と MT 4 - MMP (2) 遺伝子を比較した時に、相同性が無くなる領域の MT 4 - MMP 遺伝子配列（配列番号 17 の 1 ~ 139 番）はゲノム配列（配列番号 18）の 3008 ~ 3147 番にはほぼ一致し、その境界にはスプライシングドナー配列が存在した。MT 4 - MMP のエクソンコードする配列（配列番号 17 の 140 ~ 340 番）はゲノムの配列（配列番号 18）の 3148 ~ 3280 番及び配列番号 18 の 3564 ~ 3633 番にはほぼ一致した。以上の結果から、第一イントロンを残した転写産物が MT 4 - MMP であると結論された。

以上の結果から、ヒトでは MT 4 - MMP と MT 4 - MMP (2) の 2 種類の mRNA が発現していると考えられた。

これら 2 種類の転写産物をそれぞれ RT-PCR によって識別するために、それぞれに特異的な 5' 領域のプライマー（MT 4 - MMP : 配列番号 14, MT 4 - MMP (2) : 配列番号 15）と共に 3' プライマー（配列番号 16）を作成した。

これら転写産物の各種癌細胞における発現を表 1 に示した。

表 1 MT 4 - MMP (2) およびMT 4 - MMP の  
転写産物の癌細胞での発現

癌細胞株	MT4-MMP(2)	MT4-MMP	寄託番号
Jurkat (T cell)	++	+/-	ATCC TIB-152
Raji(B cell)	-	-	ATCC CCL-86
BJAB(B cell)	-	-	ATCC HB-136
THP-1(monocytic)	++	+	ATCC TIB-202
K562(monocytic)	++	-	ATCC CCL-243
U-937(monocytic)	++	-	ATCC CRL-1593.2
U-251 MG(astrocytoma)	++	-	発酵研 IF050288
SK-N-SH(neuroblastoma)	++	-	ATCC HTB-11
no.10(glioma)	+/-	-	発酵研 IF050368
KAL5-1(glioma)	++	-	発酵研 IF050434
MKN-7(gastric)	+	-	理化研 RCB0999
MKN-28(gastric)	-	-	理化研 RCB1000
NUGC-4(gastric)	+	-	HS財団 JCRB0834
PANC-1(pancreatic)	++	+	ATCC CRL-1469
MIA PaCa-2(pancreatic)	++	+/-	ATCC CRL-1420
SK-HEP-1(hepatoma)	++	+	ATCC HTB-52
Hep 3B(hepatoma)	++	+	ATCC HB-8064
ZR-75-1(breast)	++	+	ATCC CRL-1500
MCF7(adenocarcinoma)	++	+	ATCC HTB-22
T-24(bladder)	++	+	ATCC HTB-4
A375(melanoma)	++	+	ATCC CRL-1619
HT-1080(fibrosarcoma)	+	-	ATCC CCL-121

++:強発現、+:中程度の発現、+/-:少量発現、-:発現無し

ATCC : American Type Culture Collection

HS 財団 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

理化研 : 特殊法人理化学研究所

発酵研 : 財団法人発酵研究所

MT 4 - MMP は MT 4 - MMP (2) の発現が認められる細胞でだけ発現していた。

以上の結果から、MT 4 - MMP (2) が主たる転写産物であるが、細胞によつては類似した転写制御下に MT 4 - MMP の発現が起こっていると考えられる。

#### 実施例 5 マウス組織における MT 4 - MMP (2) の発現

4 週齢のマウスの組織を臓器ごとに切除して RNA を抽出して MT 4 - MMP (2) の発現パターンを調べた。20 μg の全 RNA を 1% アガロースゲルで泳

動しナイロンメンブレンに転写して<sup>32</sup>Pで標識したマウスMT4-MMP(2)遺伝子をプローブ用いてノーザンプロッティングを行い、MT4-MMP(2)の発現パターンを調べた。

特に発現の高い臓器は大脳、小脳、脳幹、大腸、子宮、睾丸であった。副腎、乳腺、胎盤ではほとんど発現は認められなかつた。マウスでの発現結果はPuenteらによるヒト組織での報告 [Cancer Research, 56, 944 (1996)] と一致した。

マウスの各臓器でのMT4-MMP(2)の発現は脳で非常に高く、他に大腸、子宮、睾丸など限定された組織での発現が見られ、MT1-MMP, MT2-MMPが比較的広範な組織での発現を示すのに対して特徴的であった。このことから、MT4-MMP(2)が発現臓器に特異的な細胞外基質の分解を介して、組織の恒常性維持に関与していると考えられる。

#### 実施例6 マウスMT4-MMP(2)部分ペプチド(ヘモベキシン凝血酵素様ドメイン)の大腸菌での発現

配列番号1の321～550番目に示されるアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基の付加した配列を有するマウスMT4-MMP(2)部分ペプチド(ヘモベキシン凝血酵素様ドメイン)をコードするcDNAを、マウスMT4-MMP(2)のcDNAを鋳型として用いポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法で増幅した。

得られた増幅断片を大腸菌の発現ベクターであるpET3a(宝酒造社製)にサブクローニングして、さらに大腸菌株BL21(DE3)pLysS(宝酒造社製)に導入した。該大腸菌を100 μg/mLのアンピシリン存在下、1Lの発現用培地でOD<sub>600</sub>が0.5になるまで培養して、0.4 mmol/Lのイソプロビル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)で刺激後さらに3時間培養した。

培養後、常法に基づいて大腸菌内に形成されたマウスMT4-MMP(2)部分ペプチドよりなる不溶体(inclusion body)を取得し、8 mol/L尿素、50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.6)および20 mmol/Lジチオスレイトール(DTT)を含む可溶化液に溶解した。該溶解液をHigh Q anion exchange columnにアプライし、0.2 mol/L 塩化ナトリウム溶出フラクションを回収した。

該フラクションを、50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.6)、6 mol/L 尿素、1 mmol/L ジ

チオスレイトール、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、100 mmol/L 塩化亜鉛、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液で希釈し、該希釈液にシスタミン（最終濃度 20 mmol/L）を加えた。次いで、50 mmol/L Tris-HCl(pH8.6)、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、100 mmol/L 塩化亜鉛、5 mmol/L  $\beta$  メルカプトエタノール、1 mmol/L 2-ヒドロキシエチルジスルファイド、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液を用い、4°Cで透析した。さらに、10倍量の 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5)、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、50 mmol/L 塩化亜鉛、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液で透析した（4時間×3回）。この溶液を 22000 ×g、4°C、10分間遠心分離し、沈殿を除いた。

得られた上清を 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、150 mmol/L 塩化ナトリウム、10 mmol/L 塩化カルシウムおよび 0.02% アジ化ナトリウムを含む緩衝液で平衡化した S-200 カラムクロマトグラフィーに通塔し、ゲルろ過を行い、ヘモベキシン凝血酵素様ドメインに相当するマウス MT4-MMP (2) 部分ペプチドを取得した。取得した該部分ペプチドを抗体作製のための抗原として用いた。

#### 実施例 7 マウスMT4-MMP (2) を認識するポリクローナル抗体の作製

実施例 6で調製したマウスMT4-MMP (2) 部分ペプチド100  $\mu$ gを完全フロイントアジュバントとともにウサギ（日本白色ウサギ）2羽に投与した。投与2週間後より、マウスMT4-MMP (2) 部分ペプチド100  $\mu$ gを不完全フロイントアジュバントとともに1週間に1回、計6回投与した。

耳微静脈より部分採血し、その血清抗体価を下記実施例 8 (2) に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したウサギから全採血により血清を採取した。得られた血清は下記実施例 8 (5) に示す方法によりIgG画分にまで精製し、ポリクローナル抗体として用いた。

#### 実施例 8 マウスMT4-MMP (2) を認識するモノクローナル抗体の作製

##### (1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 6で調製したマウスMT4-MMP (2) 部分ペプチド50  $\mu$ gを水酸化アルミニウムアジュバント [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory, p99, 1988). 2 mgおよび百日咳ワクチン（千葉県血清研究所製） $1 \times 10^9$ 細胞とともに5週令雌SDラットに投与した。

投与2週間後より、マウスMT4-MMP(2)部分ペプチド $50\text{ }\mu\text{g}$ を1週間に1回、計4回投与した。該ラットの眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

脾臓をMEM(Minimum Essential Medium)培地(日本製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離( $250\text{ }\times\text{g}$ 、5分)した。得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.6)を添加し、1~2分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分(細胞画分)をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

#### (2) 酵素免疫測定法

アッセイ用の抗原には実施例6で得られたマウスMT4-MMP(2)部分ペプチドを用いた。またコントロール抗原として実施例6と同様に調製された大腸菌発現ヒトMT1-MMPヘモベキシン凝血酵素様ドメイン(以下ヒトMT1-MMPと略記す。)および大腸菌体蛋白質を用いた。

各々の抗原をELISA用96穴プレートにそれぞれ $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $50\text{ }\mu\text{L}/\text{穴}$ ずつ分注し、4度で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)/ダルベッコリン酸バッファー(Phosphate buffered saline: PBS)を $100\text{ }\mu\text{L}/\text{穴}$ 加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックした。

放置後、1% BSA/PBSを捨て、該プレートに被免疫ラット抗血清、抗マウスマT4-MMP(2)モノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を $100\text{ }\mu\text{L}/\text{穴}$ 分注し、2時間放置した。該プレートを0.05%ボリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート[(ICI社商標Tween 20相当品:和光純薬社製)]/PBS(以下Tween-PBSと表記)で洗浄後、200倍希釈したベルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン(ダコ社製)を $50\text{ }\mu\text{L}/\text{穴}$ 加えて室温、1時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液(2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム、 $1\text{ mmol/L}$  ABTS/

0.1mol/Lクエン酸バッファー（pH4.2）]を添加し、発色させOD415 nmの吸光度をプレートリーダー（Emax；Molecular Devices社）を用いて測定した。

### (3) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3X63Ag8U.1（P3-U1：ATCCより購入）を正常培地で培養し、細胞融合時に $2 \times 10^7$ 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

### (4) ハイブリドーマの作製

上記（1）で得られたラット脾細胞と上記（3）で得られた骨髄腫細胞とを10：1になるよう混合し、遠心分離（250 xg、5分）した。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37°Cで、ポリエチレンギリコール-1000（PEG-1000）2 g、MEM培地2 mLおよびジメチルスルホキシド0.7 mLの混液を $10^6$ 個のラット脾細胞あたり0.2～1 mL加え、該懸濁液に1～2分間毎にMEM培地1～2 mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50 mLになるようにした。

該懸濁液を遠心分離（900 rpm、5分）し、得られた沈殿画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピベットによる吸引吸出してゆるやかにHAT培地[10%ウシ胎児血清添加RPMI培地にHAT Media Supplement（ベーリング一マンハイム社製）を加えた培地]100 mL中に懸濁した。該懸濁液を96穴培養用プレートに200 μL/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37°Cで10～14日間培養した。

培養後、培養上清を上記（2）に記載した酵素免疫測定法で調べ、マウスMT4-MMP（2）部分ペプチドに反応してヒトMT1-MMPおよび大腸菌由来蛋白に反応しない穴を選び、そこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、抗マウスMT4-MMP（2）モノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2560、KM2561、KM2562、KM2563、KM2564及び2565を得た（工業技術院生命工学工業技術研究所にそれぞれ平成11年5月27日に寄託番号KM2560: FERM BP-6730, KM2561: FERM BP-6731, KM2562: FERM BP-6732

として寄託されている) (図 1)。

#### (5) モノクローナル抗体の精製

ブリストン処理した 8 週令ヌード雌マウス (BALB/c) に上記 (4) で得られたハイブリドーマ株を  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞／匹それぞれ腹腔内注射した。10～21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまつたマウスから、腹水を採取 (1～8 mL/匹) した。

該腹水を透心分離 (1200 xg、5 分) し固形分を除去した。精製 IgM モノクローナル抗体は、該腹水を 50% 硫酸アンモニウムを用いて塩析し、塩化ナトリウム 0.5 mol/L を添加した PBS で透析後、セルロファイン GSL2000 (生化学工業社製) (ペットボリューム 750 mL) のカラムに流速 15 mL/時で通塔し IgM 画分を集めることにより取得した。

精製 IgG モノクローナル抗体は、カブリル酸沈殿法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] により精製することにより取得した。抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いた ELISA 法により決定した。結果を表 2 に示す。

表 2 抗マウス MT4-MMP (2) モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ KM2560～2565 の抗体クラス。

KM No.	抗体クラス
KM2560	IgM
KM2561	IgG2a
KM2562	IgG2a
KM2563	IgM
KM2564	IgM
KM2565	IgM

#### (6) ウエスタンプロッティング

上記 (4) で選択された抗マウス MT4-MMP (2) モノクローナル抗体の反応特異性をウエスタンプロッティングにより検討した。

実施例 6 で得られたマウス MT4-MMP (2) 部分ペプチド  $0.1 \mu\text{g}/\text{レーン}$ 、ヒ

ト MT1-MMP 0.4 µg／レーンあるいは大腸菌由来蛋白 0.1 µg／レーンを SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE : 5-20% グラジエントゲル、アトー社製) (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) を用いて分画後、PVDF膜 (ミリボア社社製) にプロッティングした。

該膜を 1% BSA-PBS でプロッキング後、該膜に抗マウス MT4-MMP (2) モノクローナル抗体の培養上清及び実施例 7 で取得されたウサギポリクローナル抗体を添加し、室温で 2 時間放置した。該膜を Tween-PBS でよく洗浄した後、第二抗体として 1000 倍希釈したベルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン抗体 [ダコ社製] を添加し、室温で 1 時間放置した。ポリクローナル抗体の場合 は 1% BSA/PBS で 20 µg/mL に希釈し、モノクローナル抗体と同様に用いた。第二抗体としてベルオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギイムノグロブリン抗体 [ダコ社製] を 1000 倍希釈して用いた。

該膜を Tween-PBS でよく洗浄した後、ECL kit (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用いて検出し、抗マウス MT4-MMP (2) モノクローナル抗体 KM2560～2565 及びウサギポリクローナル抗体が、マウス MT4-MMP (2) 部分ペプチドの分子量に相当する 26K ダルトンのバンドに特異的に反応することを確認した (図 2)。

#### 実施例 9 C O S - 1 細胞株へのヒト MT4-MMP (2) 遺伝子の遺伝子導入

遺伝子導入宿主細胞として、ATCC から購入したサル腎臓由来細胞である C O S - 1 細胞 (ATCC CRL-1650) を用いた。10 cm 培養シャーレに  $2 \times 10^5$  cells/mL に調整した培養 C O S - 1 細胞を 10 mL 加え、一晩培養を行った後、FuGENE<sup>TM</sup> 6 トランسفエクション試薬 (ベーリンガーマンハイム社製) を用いて、以下の方法にて遺伝子導入を行った。

まず、ヒト MT4-MMP (2) 遺伝子の全長 cDNA を発現ベクターである pSG5 Vector (ストラタジーン (STRATAGENE) 社製) にサブクローニング後、大腸菌株 XL-1 Blue MRF' に導入した。該大腸菌を 100 µg/mL のアンピシリン存在下、150 mL の LB(Luria-Bertani) 培地で培養を行い、NucleoBond Plasmid Kit (クローンテック (CLONTECH) 社製) の AX500 カートリッジを用い、プラスミド

DNAを精製した。

プラスチックチューブに無血清培地 OPTI-MEM<sup>®</sup>I (ライフテックオリエンタル社製)を 816 μL 加え、FuGENE を 24 μL 添加し、室温にて 5 分間静置した。該静置溶液に、Tris-EDTA (pH 8.0) で 1 μg/μL に希釈した上記ヒト MT4-MMP (2) のプラスミド DNA 溶液 12 μL を添加し、穏やかに混ぜた後、15 分間静置した。このプラスミド溶液 852 μL を前日から培養した C O S - 1 細胞株培養液に添加し、培養液を均一にした後、3 日間培養を行った。

#### 実施例 10 C O S - 1 細胞におけるヒト MT4-MMP (2) 発現の免疫染色による検出

上記方法に従い遺伝子導入した C O S - 1 細胞の培養上清を除去し、PBS を加えてセルスクレイパー (住友ベークライト社製) を用いて細胞をシャーレより回収し、 $2 \times 10^5$  個/mL となるように PBS を用いて細胞浮遊液を調整した。500 μL の細胞浮遊液をシランコート済みのスライドガラス [マツナミ社製] に、サイトスピinn 3 [シャンドン (SHANDON) 社製] を用い、40 xg で 3 分間遠心分離することで接着させた。

4% パラフォルムアルデヒド (paraformaldehyde) (和光純薬社製) を用い、4°C で 15 分間固定を行った後、PBS にて 3 分間の洗浄を 3 回行った (以下、該洗浄工程を '洗浄' と略す)。非特異的反応を除去する為、ブロッキング試薬 (ダコ社製) を 100 μL 添加し、室温にて 1 時間インキュベートした。ブロッキング試薬を除き、一次抗体として、マウス MT4-MMP (2) に対するハイブリドーマの培養上清 (KM2561, KM2562) またはコントロール抗体を産生するハイブリドーマの培養上清 (KM1764, ラット IgG2a) を 100 μL 添加し、室温にて一晩インキュベートした後、洗浄を行い、6 μg/mL に希釈したビオチン標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (ダコ社製、0.25% 正常ウサギ血清含有) を 100 μL 添加し、室温にて一時間反応させた。

洗浄後、内在性ペルオキシダーゼを不活化させる為、0.3%過酸化水素水/ 0.1 mol/L アジ化ナトリウムを用い室温で 30 分間インキュベートを行った。洗浄後、使用 30 分前に調整しておいたアビジンビオチン複合体 [ベクター (VECTOR)

社製】を  $100 \mu\text{L}$  添加し、室温で 30 分間反応させた。洗浄後、ジアミノベンジン [Diaminobenzidine (ベクター社製)] を用い、マウス MT4-MMP (2) の発現を検出した。対比染色としてヘマトキシリソ染色を行い、観察を行った。なお、ネガティブコントロールとして MT4-MMP (2) プラスミド DNA を添加せず同様の処理を行った無処置 COS-1 細胞を用いた。図 3 に示したように、ヒト MT4-MMP (2) 遺伝子導入を行った COS-1 細胞において、KM2561 及び KM2562 に特異的な反応が認められた。

#### 実施例 1.1 蛍光抗体法によるヒト MT4-MMP (2) の検出

上記方法に従い遺伝子導入した COS-1 細胞及び無処置 COS-1 細胞の培養上清を除去し、PBS を加えてセルスクレイバー (住友ベークライト社製) を用いて細胞をシャーレより回収し、 $1 \times 10^6$  個/mL となるよう PBS を用いて細胞浮遊液を調整した。その液  $1 \text{ mL}$  をプラスチックチューブに入れ、遠心分離後、上清を吸引除去した。細胞の固定には FIX&PERM Cell Permeabilization Kits [カルタグ (Caltag) 社製] を用いた。固定した細胞に抗 MT4-MMP (2) 抗体 (KM2561, KM2562 培養上清)  $50 \mu\text{L}$  を添加し、搅拌後  $4^\circ\text{C}$  で 1 時間反応した。

PBS を用いて遠心洗浄後、100 倍希釈したビオチン標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン抗体 (ダコ社製)  $50 \mu\text{L}$  を加え  $4^\circ\text{C}$  で 1 時間反応した。PBS を用いて遠心洗浄後、200 倍希釈した streptavidin-FITC [Streptavidine-Fluorescein isothiocyanate conjugate, ファーミンジエン (Pharmingen) 社製]  $50 \mu\text{L}$  を加え  $4^\circ\text{C}$  30 分反応した。PBS を用いて遠心洗浄後、FACScan [ベクトンディッキンソン (Becton Dickinson) 社製] で測定した。図 4 に示したように KM2561, KM2562 により、遺伝子導入 COS-1 細胞で発現されたヒト MT4-MMP (2) が検出された。縦軸は細胞数、横軸 (FL1-H) は蛍光強度、また点線はコントロール (MT4-MMP (2) を認識するモノクローナル抗体のかわりに MT4-MMP (2) を認識しない KM1764 を添加)、実線は抗マウス MT4-MMP (2) モノクローナル抗体 KM2561 または KM2562 添加時のパターンを示す。

### 実施例 1 2 ウエスタンブロッティングによるヒト MT4-MMP (2) の検出

下記細胞株を遠心分離して細胞を回収した後、上清除去後、細胞ペレットに可溶化液 [50 mmol/L HEPES、250 mmol/L 塩化ナトリウム、1% NP40、1mmol/L DTT、1 mmol/L フェニルメチルスルフォニルフルオリド (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)、5 µg/mL ロイペプチノン (Leupeptin)] を添加し、良く混和した後、4°C で10分間静置した。7000 x g、30分間遠心分離し、上清を回収し、サンプルとして使用した。

タンパク定量試薬 [Protein assay、バイオラド (Bio-Rad) 社製] により蛋白定量後、100 µg/レーンのサンプルを SDS-PAGE (7.5% アクリルアミド) に処し、前述 [実施例 8 (6)] の方法で、抗マウスMT4-MMP (2) モノクローナル抗体 KM2561を用いウエスタンブロッティングを行った。細胞株 (いずれもATCCから購入) はU937 [ヒト細網肉腫 (human histiocytic lymphoma)]、THP-1 [ヒト単球 (human monocyte)]、Jurkat [ヒト急性T細胞白血病 (human acute T cell leukemia)] を用いた。図5に示したようにいずれの細胞でも68キロダルトン (kd) マーカー付近にヒトMT4-MMP (2) が検出された。

### 実施例 1 3 マウスMT 5 -MMP 遺伝子のクローニング

マウスマト3-MMP遺伝子を単離するために、マウス17日胚の脳 cDNA ライブライリーを ZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene)を用い、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

ヒトMT3-MMP遺伝子をプローブとして上記cDNAライブラリーのスクリーニングをブラークハイブリダイゼーション法により行った。強いシグナルと弱いシグナルを示すブラークが得られたため、それらのクローンの塩基配列を決定した。

弱いシグナルを示すクローンを解析した結果、その中の一つの2.1 kbの配列はヒトならびにラットMT3-MMPと弱い相同性を示すが、他のMMPとも相同性が大幅に異なることから、新規のMMP遺伝子であると考えられた。

統いて、上記ライブラリーからブラークハイブリダイゼーション法により2.1 kbの配列とハイブリダイズする3.7 kbのcDNAを取得した。2.1 kb

bと3.7 kbの配列から、配列番号7に示す4.2 kbのcDNA配列が得られた。

配列番号7に示すcDNAには配列番号5で表される618アミノ酸の蛋白質がコードされていた。配列番号5のペプチドはMT-MMPの各ドメインに相当する配列をよく保存された状態で持っていることから、新規のMT-MMP、即ち、マウスMT5-MMPであると結論された(図6)。

#### 実施例14 ヒトMT5-MMP遺伝子のクローニング

マウスMT5-MMPに対応するヒト遺伝子を確認する為に、マウスMT5-MMP遺伝子をプローブとしてヒト腎臓cDNAライブラリー(クロンテック社製)のスクリーニングを上記実施例13と同様の方法でブラークハイブリダイゼーションを行い、マウスMT5-MMPと92%の相同性を有し、既知のMT-MMPとは異なる遺伝子を得た。

解析したヒトMT5-MMPのcDNAクローニングは全て、シグナルペプチドをコードするはずの5'領域を欠いていたため、以下に示す5'RACE法によって欠損部分の配列を決定し、ヒトMT5-MMPをコードする全領域を含む遺伝子配列を決定した。

cDNAをsuperscript II(ギブコBRL)を使用して、ヒト脳のpoly(A)+RNA(クロンテック社製)とヒトMT5-MMP選択的なプライマー(配列番号19)を用いて、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

得られたcDNAに単一鎖のオリゴヌクレオチドアダプター(配列番号10)をT4 RNAリガーゼでつなぎ、MT5-MMP選択的なプライマー(配列番号19)とアダプター選択的なプライマー(配列番号11)でGC緩衝液とLA Taq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。

PCR後、遺伝子選択的な他のプライマー(配列番号20)とアダプター選択的なプライマー(配列番号13)を用いてPCRを行った。マウス遺伝子をプローブとしてヒト腎臓cDNAライブラリーから得られた配列と5'RACE法によって得られた配列から、配列番号6の645アミノ酸の蛋白質をコードする配列番号8の2.6 kbのcDNAが取得できた。

### 実施例 15 MT 5 - MMP の mRNA の臓器での発現

組織におけるMT 5 - MMP 遺伝子発現をノーザン・プロッティングで調べた。

即ち、 $20 \mu\text{g}$  の全RNAを1%アガロースゲルで泳動しナイロンメンブレンに転写し、 $^{32}\text{P}$ で標識したマウスMT 5 - MMP 遺伝子をプローブに用いてノーザンプロッティングを行い、約 $4\text{ k b}$  のMT 5 - MMP のmRNAの発現パターンを調べた。

2週齢のマウスでは、発現は脳にのみ強いシグナルが観察され、他の臓器の組織では脳に比べて検出限界かそれ以下の低い発現しか認められなかつた。

ヒトの組織での発現をヒトMT 5 - MMP 遺伝子をプローブに用いて multiple tissue blot (クロントック社製) を行って調べたところ、脳に高発現であった。 $^{32}\text{P}$ で標識したヒトMT 5 - MMP 遺伝子をプローブに用いてノーザンプロッティングを行い、ヒト脳でも $4.0\text{ k b}$  と $4.8\text{ k b}$  のMT 5 - MMP のmRNAの強い発現が認められた。ヒトではそれ以外に腎臓と脾臓で発現が認められた。脳では $4.8\text{ k b}$  のmRNAが、腎臓と脾臓では $4.0\text{ k b}$  のmRNAが強く発現していた。

MT 5 - MMP 特異的なプライマー（配列番号21および22）を用いた、RT - PCRによる解析では腎臓、脾臓ともに脳と同じサイズのDNA断片が同程度の効率で増幅し、サイズの異なるプロダクトが見られないことから、短い転写産物も完全なコーディング領域を持つと考えられる。

MT 5 - MMP の発現をマウス及びヒトで調べると特徴的な発現が脳に見られた。特にマウスで見る限り、発現は脳に限局しており、他の臓器での発現は非常に低かった。

脳の発現に特徴があることから、脳の組織別プロット (human brain multiple tissue blot : クロントック社製) を用い、部位特異的発現を調べた。

MT 5 - MMP の発現は小脳に高い発現が見られる他、大脳皮質、髓質、後頭部、前頭部、側頭部、被殻での発現が認められたが、脊髄での発現は見られなかつた。

この結果は、他のMT - MMP が様々な組織で発現するのとは異なる、MT 5

-MMP特有の際だった特徴を示している。

ヒトでも、脳の発現は強く、それ以外にも腎臓及び脾臓での発現が見られた。ヒト脳の部位特異的な発現を調べると、小脳での高発現が特徴的であった。小脳での高発現はマウスでも確認された。

この結果は、MT5-MMPは脳組織の形成と維持、神経回路構築などの過程に伴う細胞周辺の細胞外基質分解を制御している可能性を示している。

#### 実施例16 MT5-MMPのmRNAの癌細胞での発現

MT1-MMPは多くの癌組織で、癌細胞自身及び周辺の間質細胞で高頻度に発現しており、ゼラチナーゼAの組織レベルでの活性化因子として働いている。様々な癌細胞株における発現をMT5-MMP特異的なプライマー（配列番号21および22）を用いて、RT-PCRで調べた。

結果を表3に示した。

表 3 MT 5 - MMP 転写産物の癌細胞での発現

癌細胞株	MT5-MMP	寄託番号
Jurkat (T cell)	-	ATCC TIB-152
Raji (B cell)	-	ATCC CCL-86
BJAB (B cell)	-	ATCC HB-136
THP-1(monocytic)	-	ATCC TIB-202
K562(monocytic)	-	ATCC CCL-243
U-937(monocytic)	-	ATCC CRL-1593.2
U-251 MG(astrocytoma)	-	発酵研 IF050288
SK-N-SH(neuroblastoma)	+++	ATCC HTB-11
no.10(glioma)	++	発酵研 IF050368
KALS-1(glioma)	+++	発酵研 IF050434
MKN-7(gastric)	+	理化研 RC80999
MKN-28(gastric)	-	理化研 RC81000
NUGC-4(gastric)	+	HS財団 JCRB0834
PANC-1(pancreatic)	+	ATCC CRL-1469
MIA PaCa-2(pancreatic)	+	ATCC CRL-1420
SK-HEP-1(hepatoma)	+	ATCC HTB-52
Hep 3B(hepatoma)	+	ATCC HB-8064
ZR-75-1(breast)	?	ATCC CRL-1500
MCF7(adenocarcinoma)	-	ATCC HTB-22
T-24(bladder)	-	ATCC HTB-4
A375(melanoma)	+/-	ATCC CRL-1619
HT-1080(fibrosarcoma)	+/-	ATCC CCL-121

+++ : 非常に強発現、 ++ : 強発現、 + : 中程度の発現、 +/- : 少量発現、 - : 発現無し

ATCC : American Type Culture Collection

HS 財団 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

理化研 : 特殊法人理化学研究所

発酵研 : 財団法人発酵研究所

MT 1 - MMP が様々な癌細胞株で発現しているのに対して、MT 5 - MMP の発現細胞は限られていたが、脳での発現に一致して神経系由来の神経芽細胞腫 [SK-N-SH (HTB-11, ATCC)]、未分化型グリオーマ [no.10 (IF050368, 発酵研究所)]、グリオーマ [KALS-1 (IF050434, 発酵研究所)] で高い発現が見られた。

また、膵臓癌 [PANC-1 (CRL-1469, ATCC) , MIA PaCa-2 (CRL-1420, ATCC) ]、肝癌 [SK-HEP-1 (HTB-52, ATCC) , Hep 3B (HB-8064, ATCC) ] での発現が特徴的であった。

MT - MMP の細胞表面での異常発現は細胞の浸潤性を亢進させることが考え

られる。実際にMT1-MMPの過剰発現は癌細胞株の浸潤能を亢進させ、実験的転移を高発させる。ヒト癌組織では癌細胞や周辺の線維芽細胞がMT1-MMPを高頻度で発現しており、MT1-MMPが発現場所で活性化させるゼラチナーゼAの存在は癌の浸潤・転移とよく相関する。

未分化型グリオーマ、グリオーマ、脳膜癌、肝がんの細胞株で発現が見られることから、特定のタイプの癌ではMT5-MMPの過剰発現が癌細胞の悪性性質に関与している可能性が示唆された。

#### 実施例17 MT5-MMPを認識するポリクローナル抗体の作成

大腸菌で発現させたMT5-MMP部分ペプチド、具体的には下記実施例19で合成された配列番号23～27に示されるMT5-MMP部分ペプチド（化合物1～5）100μgを完全フロイントアジュバントとともにウサギ（Japanese White Rabbit）2羽に投与する。

投与2週間後より、MT5-MMP部分ペプチド100μgを不完全フロイントアジュバントとともに1週間に1回、計6回投与する。

耳微静脈より部分採血し、その血清抗体価を下記実施例18(2)に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したウサギから全採血により血清を採取する。

得られた血清は下記実施例18(5)に示す方法により1gG画分にまで精製し、ポリクローナル抗体として用いる。

#### 実施例18 MT5-MMPを認識するモノクローナル抗体の作成

##### (1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

大腸菌で発現させたMT5-MMP部分ペプチド、具体的には下記実施例19で合成された配列番号23～27に示されるMT5-MMP部分ペプチド（化合物1～5）50μgをアルミニウムゲル2mgおよび百日咳ワクチン（千葉県血清研究所製）1×10<sup>9</sup>細胞とともに5週令雌ラット（SD）に投与する。

投与2週間後より、MT5-MMP部分ペプチド50μgを1週間に1回、計4回投与する。

該ラットの眼底静脈より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫3日後に脾臓を摘出する。

脾臓をMEM培地（日本製薬社製）中で細断し、ピンセットではぐし、透心分離（1,200 rpm、5分）する。

得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH 7.65）を添加し、1～2分間処理することにより赤血球を除去する。

得られた沈殿画分（細胞）をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いる。

### (2) 酵素免疫測定法

アッセイ用の抗原には上記MT5-MMP部分ペプチドを用いる。またコントロール抗原としてヒトMT1-MMPヘモベキシン凝血酵素様ドメイン（以下ヒトMT1-MMPと略記す。）を用いる。

各々の抗原をELISA用96穴プレートにそれぞれ10 μg/mL、50 μL/穴ずつ分注し、4°Cで一晩放置して吸着させる。

該プレートを洗浄後、1%BSA-PBSを100 μL/穴加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックする。

放置後、1%BSA-PBSを捨て、該プレートに被免疫ラット抗血清、抗MT5-MMPモノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を50 μL/穴分注し、2時間放置する。

該プレートをTween-PBSで洗浄後、ベルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン（ダコ社製）を50 μL/穴加えて室温、1時間放置する。

該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を添加し、発色させOD 415 nmの吸光度をプレートリーダー(Emax; Molecular Devices 社)を用いて測定する。

### (3) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3-U1を正常培地で培養し、細胞融合時に $2 \times 10^7$ 以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供する。

#### (4) ハイブリドーマの作製

上記(1)で得られたラット脾細胞と(3)で得られた骨髄腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離(1,200 rpm、5分)する。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37°Cで、ポリエチレングライコール-1,000(P E G - 1,000)2g、MEM培地2mLおよびジメチルスルホキシド0.7mLの混液を10<sup>8</sup>ラット脾細胞あたり0.2~1mL/加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地1~2mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにする。

該懸濁液を遠心分離(900 rpm、5分)し、得られた沈殿画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞をメスピベットによる吸込み、吸出しでゆるやかにHAT培地100mL中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100μL/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37°Cで10~14日間培養する。

培養後、培養上清を上記(2)に記載した酵素免疫測定法で調べ、MT5-MMP部分ペプチドに反応してヒトMT1-MMPに反応しない穴を選び、限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、抗MT5-MMPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立する。

#### (5) モノクローナル抗体の精製

ブリストン処理した8週令ヌード雌マウス(Balb/c)に上記(4)で得られるハイブリドーマ株を5~20×10<sup>6</sup>細胞/匹それぞれ腹腔内注射する。

10~21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまつたマウスから、腹水を採取(1~8mL/匹)する。

該腹水を遠心分離(3,000 rpm、5分)し、固形分を除去する。

精製1gMモノクローナル抗体は、50%硫酸アンモニウムを用いて塩析し、塩化ナトリウム0.5Mを添加したPBSで透析後、セルロフアインGSL2000(生化学工業社製)(ベッドボリューム750mL)のカラムに流速1.5mL/時で通塔し1gM画分を集めることにより取得する。

精製 IgG モノクローナル抗体は、カブリル酸沈殿法 (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) により精製することにより取得する。

抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いた E L I S A 法で決定する。

#### (6) ウエスタンプロッティング

上記 (4) で選択された抗 MT5-MMP モノクローナル抗体の反応特異性をウエスタンプロッティングにより検討する。

MT5-MMP 部分ペプチドあるいはヒト MT1-MMP を  $1 \mu\text{g}$  / レーンで SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) を用いて分画後、 P V D F 膜にプロッティングする。

該膜を B S A - P B S でブロッキング後、該膜に抗 MT5-MMP モノクローナル抗体の培養上清を添加し、室温で 2 時間放置する。

該膜を P B S - T w e e n でよく洗浄した後、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (ダコ (DAKO) 社製) を添加し、室温で 1 時間放置する。

該膜を P B S - T w e e n でよく洗浄した後、 Colour development reagent (バイオラッド社製) を用いて検出し、抗 MT5-MMP モノクローナル抗体が、 MT5-MMP の分子量に相当するバンドに特異的に反応することを確認する。

#### 実施例 19 ヒト MT5-MMP 部分ペプチドの合成

ヒト MT5-MMP 部分ペプチド (化合物 1 ~ 5) を、配列番号 6 記載のアミノ酸配列をもとに合成した。

#### 略号

本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関する IUPAC-IUB 委員会 (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) の勧告 [ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリ

— (European Journal of Biochemistry), 138巻, 9頁(1984年)に従った。

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

Ala:L-アラニン

Asn:L-アスパラギン

Asp:L-アスパラギン酸

Arg: L-アルギニン

Cys:L-システイン

Gln:L-グルタミン

Glu: L-グルタミン酸

Gly: グリシン

His: L-ヒスチジン

Ile:L-イソロイシン

Leu: L-ロイシン

Lys:L-リジン

Met: L-メチオニン

Phe: L-フェニルアラニン

Pro: L-プロリン

Ser: L-セリン

Thr: L-スレオニン

Trp:L-トリプトファン

Tyr: L-チロシン

Val: L-バリン

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

Fmoc: 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル

Ac: アセチル

tBu: t-ブチル

Boc: t-ブチルオキシカルボニル

Trt: トリチル

Pmc: 2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル

Fmoc-Thr(tBu)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-スレオニン

Fmoc-Ser(tBu)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-セリン

Fmoc-Tyr(tBu)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-チロシン

Fmoc-Lys(Boc)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>c</sup>-t-ブチルオキシカルボニル-L-リジン

Fmoc-Glu(OtBu)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステル

Fmoc-Arg(Pmc)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>a</sup>-2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル-L-アルギニン

Fmoc-His(Trt)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>me</sup>-トリチル-L-ヒスチジン

Fmoc-Trp(Boc)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>ind</sup>-t-ブチルオキシカルボニル-L-トリプトファン

Fmoc-Asn(Trt)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>d</sup>-トリチル-L-アスパラギン

Fmoc-Asp(OtBu)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸-β-t-ブチルエステル

Fmoc-Gln(Trt)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>e</sup>-トリチル-L-グルタミン

Fmoc-Cys(Trt)-OH: N<sup>a</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-S-トリチル-L-システイン

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

HBTU: 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェイト

HOtBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド

TFA: トリフルオロ酢酸

DIEA: ジイソプロピルエチルアミン

(1) 化合物 1 (配列番号 23) Ac-Pro-Val-Thr-Gly-Val-Leu-Asp-Gln-Thr-Thr-Ile-Glu-Trp-Met-Lys-Lys-Cys-OH の合成

H-Cys(Trt)が 16.8  $\mu\text{mol}$  結合した担体樹脂 (Cl-Trt レジン、Ana Spec 製) 30 mg を自動合成機 (島津製作所) の反応容器に入れ、1mL の DMF を加えて 10 分間攪拌し溶液を排出し、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

(a) Fmoc-Lys(Boc)-OH (200  $\mu\text{mol}$ )、HBTU (200  $\mu\text{mol}$ )、HOEt 1 水和物 (200  $\mu\text{mol}$ ) および DIEA (400  $\mu\text{mol}$ ) を DMF (800  $\mu\text{L}$ ) 中で 3 分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を 30 分間攪拌し、溶液を排出した。

(b) 担体樹脂を 900  $\mu\text{L}$  の DMF で 1 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した。こうして、Fmoc-Lys(Boc)-Cys(Trt)を担体上に結合した。

次に以下の Fmoc 基脱保護工程を行った。

(c) 30% ピペリジン-DMF 溶液 900  $\mu\text{L}$  を加えて混合物を 4 分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう 1 回繰り返した。

(d) 担体樹脂を 600  $\mu\text{L}$  の DMF で 1 分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を 5 回繰り返した。

こうして、Fmoc 基を除去した H-Lys(Boc)-Cys(Trt)の結合した担体樹脂を得た。次に、(a) の工程で Fmoc-Lys(Boc)-OH を用いて縮合反応を行い、(b) の洗浄工程、次いで(c)、(d)の脱保護工程を経て、H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Cys(Trt)が担体上に合成された。以下、工程(a)において、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Pro-OH を順次用いて、(a)～(d)を繰り返した。

次に無水酢酸 32  $\mu\text{L}$ 、DMF900  $\mu\text{L}$  を用いて N 末端にアセチル基を導入した。

その後、DMF、メタノール及びブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下 12 時間乾燥して、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA (90%)、チオアニソール (5%)、1,2-エタンジチオール (5%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 2 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約 10mL を加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収、減圧乾燥し、粗ペプチド 42.1mg を取得した。この粗生成物を 90% 酢酸 5mL に希釈し、逆相カラム（資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mmI.D. X 25mm）を用いた HPLC で精製した。0.1% TFA 水溶液に、TFA 0.1% を含む 90% アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nm で検出し、化合物 1 を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、化合物 1 を 3.2mg 得た。

質量分析 [FABMS] ; m/z = 1991.7 (M+H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析; Asx 1.1 (1), Glx2.1(2), Gly1.1(1), Thr 2.9(3), Pro 1.0 (1), Val 1.8(2), Met 1.1(1), Lys2.0(2), Ile1.0(1), Leu1.0(1), Cys1.1(1)

(2) 化合物 2 (配列番号 24) Ac-His-Glu-Ile-Lys-Ser-Asp-Arg-Lys-Glu-Ala-Asp-Ile-Met-Ile-Phe-Phe-Ala-Ser-Cys-OH の合成

H-Cys(Trt)が 16.8 μ mol 結合した担体樹脂 (Cl-Trt レジン、Ana spec 製) 30mg を出発物質とし、上記 (1) と同様にして、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH を順次縮合した後に、無水酢酸を用いて N 末端にアセチル基を導入した。洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。TFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%) およびチオエノール (2%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 8 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。以降上記 (1) と同様にして、粗ペプチド 38mg を取得し、逆相

カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 2 を 3.1mg 得た。

質量分析 [FABMS] ; m/z = 2283.3 (M+H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析; Asx 2.1(2), Glx 2.2(2), Ser 1.7(2), His 0.9(1), Arg 1.0(1), Ala 2.2(2), Met 1.0(1), Lys 2.0(2), Ile 2.9(3), Phe 2.1(2), Cys 1.2(1)

(3) 化合物 3 (配列番号 25) Ac-Leu-Pro-Val-Arg-Arg-Ile-His-Ser-Pro-Ser-Glu-Arg-Lys-His-Glu-Arg-Gln-Cys-OH の合成

H-Cys(Trt)が 16.8 μmol 結合した担体樹脂 (Cl-Trt レジン、Ana spec 製) 30mg を出発物質とし、上記 (1) と同様にして、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Leu-OH を順次縮合した後に、無水酢酸を用いて N 末端にアセチル基を導入した。洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。TFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフイド (3%)、1,2-エタングリオール (2.5%) およびチオフェノール (2%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 8 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。以降上記 (1) と同様にして、粗ペプチド 49.2mg を取得し、逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 3 を 20.4mg 得た。

質量分析 [FABMS] ; m/z = 2271.4 (M+H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析; Glx 2.9(3), Ser 2.0(2), His 1.9(2), Arg 4.0(4), Pro 2.2(2), Val 1.0(1), Lys 1.1(1), Ile 0.8(1), Leu 1.1(1), Cys 1.2(1)

(4) 化合物 4 (配列番号 26) H-Cys-Asn-Gln-Lys-Glu-Val-Glu-Arg-Arg-Lys-Glu-Arg-Arg-Leu-Pro-Gln-Asp-NH<sub>2</sub> の合成

Fmoc-NH が 16.5 μmol 結合した担体樹脂 (RINK Amide MBHA レジン、Nova Biochem 製) 30mg を出発物質とし、上記 (1) と同様にして、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Leu-OH、

Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OHを順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。TFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%) およびチオフェノール (2%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 8 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。以降上記(1)と同様にして、粗ペプチド 52.8mg を取得し、逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 4 を 21.3mg を得た。

質量分析 [FABMS] ; m/z = 2183.6 (M+H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析; Asx 1.9 (2), Glx 5.1(5), Arg 3.9(4), Trp 1.1(1), Val 1.0(1), Lys 2.0 (2), Leu 1.0 (1), Cys 0.8 (1)

#### (5) 化合物 5 (配列番号 27) H-Cys-Asn-Lys-Thr-Gly-Pro-Gln-Pro-Val-Thr-Tyr-Tyr-Lys-Arg-Pro-Val-Gln-Glu-Trp-Val-OH の合成

Fmoc-Val が 15.6 μmol が結合した担体樹脂 (Wang レジン、島津社製) 30mg を出発物質とし、上記(1)と同様にして、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。TFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%)、チオフェノール (2%) 及び 2-メチルインドール (5mg/mL) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 6 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。以降上記(1)と同様にして、粗ペプチド 52.8mg を取得し、逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 5 を 16.2mg 得た。

質量分析 [FABMS] ; m/z = 2394.3 (M+H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析; Asx 1.0 (1), Glx 3.1 (3), Gly 1.0(1), Arg 1.0(1), Thr 1.9(2), Pro 3.1 (3), Tyr 2.0(2), Val 3.0(3), Lys 1.9 (2), Cys 1.1(1)

#### 実施例 2 0 ヒトMT5-MMPを認識するポリクローナル抗体の作製

##### (1) 免疫原の調製

実施例 1 9 で得られたヒトMT5-MMPの部分ペプチドである化合物 1 ~ 5 は、免疫原性を高める目的で以下の方法で KLH (カルビオケム社)とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLHをPBSに溶解して 10 mg / mL に調整し、1/10 容量の 25 mg / mL MBS [N-(m-Maleimidobenzoyloxy)succinimide;ナカライテスク社]を滴下して 30 分攪拌反応させる。あらかじめ PBS で平衡化したセファアデックス G-25 カラムなどのゲルろ過カラムでフリーの MBS を除いて得られた KLH-MB 2.5 mg を 0.1 M りん酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) に溶解したペプチド 1 mg と混合し、室温で 3 時間、攪拌反応させた。反応後、PBS で透析したものを免疫原として用いた。

##### (2) 動物の免疫とポリクローナル抗体の作製

上記 (1) で調製した化合物 1、2 および 4 の KLH コンジュゲートを等量ずつ混合したもの 200 μg を完全フロイントアジュvant とともにウサギ (日本白色ウサギ) 2羽に投与した。投与 2週間後より、混合 KLH コンジュゲート (化合物 1、2、4) 200 μg を不完全フロイントアジュvant とともに 1週間に 1回、計 7 回投与した。

耳微静脈より部分採血し、その血清抗体価を下記実施例 2 1 (2) に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したウサギから全採血により血清を採取した。得られた血清は下記実施例 2 1 (5) に示す方法により IgG 画分にまで精製し、ポリクローナル抗体として用いた。

得られたポリクローナル抗体の化合物 1、2、4 に対する反応性を実施例 2 1 (2) に示す酵素免疫測定法により調べた。その結果、図 7 に示すように、ロツ

ト 1、2 いずれについても化合物 1 と 2 について特異的な抗体価の上昇が認められた。化合物 4 については抗体価は上昇しなかった。

### 実施例 21 ヒト M T 5 - M M P を認識するモノクローナル抗体の作製

#### (1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 19 で調製した化合物 1 ~ 5 の K L H コンジュゲート 1 0 0  $\mu$  g をそれぞれ水酸化アルミニウムアジュvant (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p99, 1988) 2 mg および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1  $\times$  10<sup>9</sup> 細胞とともに 5 週令雌 BALB/c マウス各 3 匹に投与した。投与 2 週間後より、各 K L H コンジュゲート 1 0 0  $\mu$  g を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。該マウスの眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

脾臓を M E M (Minimum Essential Medium) 培地 (日本製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (250 xg, 5 分) した。得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.6) を添加し、1 ~ 2 分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分 (細胞画分) を M E M 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

#### (2) 酵素免疫測定法 (バインディング E L I S A)

アッセイ用の抗原には実施例 19 で得られた各化合物をサイログロブリン (以下、T H Y と略す。) とコンジュゲートしたものを用いた。作製方法は実施例 20 (1) に記した通りであるが、架橋剤には M B S の代わりに S M C C [4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimido ester; シグマ社] を用いた。9 6 穴の E I A 用プレート (グライナー社) に、上記のように調製したコンジュゲートを 1 0  $\mu$  g / mL, 5 0  $\mu$  L / 穴で分注し、4 度で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1% 牛血清アルブミン (BSA) / ダルベッコリん酸バッファー (Phosphate buffered saline : PBS) を 100  $\mu$  L / 穴加え、室温で 1 時間放置し、残っている活性基をブロックした。

放置後、1% BSA/PBS を捨て、該プレートに被免疫マウス抗血清、抗ヒト M T

5-MMPモノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を50 μL／穴分注し、2時間放置した。該プレートを0.05% ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート[ (ICI社商標Tween 20相当品：和光純薬社製) ]/PBS(以下Tween-PBSと表記)で洗浄後、ベルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリンを50 μL／穴加えて室温、1時間放置した。被免疫ウサギ抗血清もしくはIgG画分の場合には、同様に反応させた後、第二抗体として200倍希釈したベルオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギイムノグロブリン(ダコ社製)を用いた。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム、1mmol/L ABTS/0.1mol/Lクエン酸バッファー(pH4.2)]を添加し、発色させOD415 nmの吸光度をプレートリーダー(Emax; Molecular Devices社)を用いて測定した。

#### (3) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3X63Ag8U.1(P3-U1: ATCCより購入)を正常培地(10%ウシ胎児血清添加RPMI培地)で培養し、細胞融合時に2×10<sup>7</sup>個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

#### (4) ハイブリドーマの作製

上記(1)で得られたマウス脾細胞と上記(3)で得られた骨髄腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離(250 xg、5分)した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37°Cで、ポリエチレングリコール-1000(PEG-1000)2g、MEM培地2mLおよびジメチルスルホキシド0.7mLの混液を10<sup>6</sup>個のマウス脾細胞あたり0.5mL加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地1mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにした。

該懸濁液を遠心分離(900 rpm、5分)し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピベットによる吸込み吸出しでゆるやかにHAT培地[10%ウシ胎児血清添加RPMI培地にHAT Media Supplement(ベーリンガーマンハイム社製)を加えた培地]100mL中に懸濁した。該懸濁液を96穴培養用プレートに200 μL／穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37°Cで10~

14日間培養した。

培養後、培養上清を上記(2)に記載した酵素免疫測定法で調べ、抗原ペプチドに反応してコントロールペプチドに反応しない穴を選びそこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。化合物3を抗原に用いてハイブリドーマKM2645～2655を、化合物5を抗原に用いてハイブリドーマKM2656～2661を取得した。

ハイブリドーマKM2655およびKM2658は、それぞれFERM-BP-6883およびFERM-BP-6884として、平成11年9月21日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。

図8に示すように、いずれのハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体も免疫原に用いた化合物に特異的な反応性を示した。

#### (5) モノクローナル抗体の精製

ブリストン処理した8週令ヌード雌マウス(BALB/c)に上記(4)で得られたハイブリドーマ株を $5\sim20\times10^6$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10～21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまつたマウスから、腹水を採取(1～8 mL/匹)した。

該腹水を遠心分離(1200 xg、5分)し、固形分を除去した。

精製IgGモノクローナル抗体は、カブリル酸沈殿法[Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]により精製することにより取得した。モノクローナル抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いたELISA法により表4に示すように決定された。

表4 抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ  
KM2645～2661の抗体クラス。

KM No.	サブクラス
KM2645	G1
KM2646	G1
KM2647	G1
KM2648	G2b
KM2649	G2b
KM2650	G2b
KM2651	G1
KM2652	G2b
KM2653	G2b
KM2654	G2a
KM2655	G1
KM2656	G1
KM2657	G1
KM2658	G1
KM2659	G1
KM2660	G1
KM2661	G1

実施例22 抗ヒトMT5-MMP抗体を用いたヒトMT5-MMP蛋白質の検出

(1) COS-1細胞株へのヒトMT5-MMP遺伝子の遺伝子導入

まず、ヒトMT5-MMP遺伝子の触媒ドメインのN末にFLAGエピトープ(DYKDDDDK、配列番号28)をPCR extension法にて挿入した。得られたヒトMT5-MMP-FLAG遺伝子を発現ベクターである pTL1 Vector [ストラタジーン(STRATAGENE)社製 pSG5 Vector に SacI, Kph1、および SmaI 制限酵素サイトを挿入したもの]にサブクローニングして、さらに大腸菌株 XL-1S<sub>R</sub>/MRF'に導入した。該大腸菌を 100 µg/mL のアンピシリン存在下、150mL の LB(Luria-Bertani)培地で培養を行い、NucleoBond Plasmid Kit [クロントック(CLONTECH)社製] の AX500 カートリッジを用い、プラスミドDNAを精製した。

遺伝子導入宿主細胞として、ATCC から購入したサル腎臓由来細胞である C O S - 1 細胞(ATCC CRL-1650)を用いた。5 cm 培養シャーレに  $2 \times 10^5$  cells/mL に調整した培養C O S - 1 細胞を 5 mL 加え、一晩培養を行った後、FuGENE<sup>TM</sup>6 トランスフェクション試薬(ベーリングガーマンハイム社製)を用いて、以下の方法で遺伝子導入を行った。

プラスチックチューブに無血清培地 OPTI-MEM<sup>R</sup> I (ライフテックオリエンタル社製)を 408  $\mu$ L 加え、FuGENE を 12  $\mu$ L 添加し、室温にて 5 分間静置した。別のプラスチックチューブに Tris-EDTA (pH 8.0) で 1  $\mu$ g/ $\mu$ L に希釈した上記ヒト MT5-MMP のプラスミド DNA 溶液 6  $\mu$ L に添加し、調整した FuGENE 溶液を更に添加し、穏やかに混ぜた後、15 分間静置した。このプラスミド溶液 426  $\mu$ L を前日から培養したC O S - 1 細胞株に添加し、培養液を均一にした後、3 日間培養を行った。また、同様の方法によりヒト MT4-MMP (2) の遺伝子導入も行なった。

#### (2) ウエスタンブロッティングによるヒトMT5-MMP蛋白質の検出

上記 (1) 記載の方法に従い遺伝子導入したC O S - 1 細胞及び無処置C O S - 1 細胞をビベッティングにより回収した。PBSで一回洗浄後、 $1 \times 10^7$  個/mL となるように SDS-S-ボリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 用サンプルバッファー[0.06mol/L Tris-HCl (PH6.8), 2% SDS, 10% グリセロール, 5% 2-メルカプトエタノール]を加え、100°Cで 5 分間加熱し、さらに超音波処理を行うことにより完全に細胞を可溶化した。

上記のように調製した細胞可溶化液を 10  $\mu$ L ( $1 \times 10^8$  個)/レーンで SDS-PAGE (5-20%グラジエントゲル、アトー社製) (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) で分画した後、PVDF膜(ミリボア社製)にプロッティングした。

該膜を 1% BSA-PBS でブロッキング後、該膜に抗ヒト MT5-MMPモノクローナル抗体の培養上清を原液で添加し、室温で 2 時間放置した。該膜を Tween-PBS でよく洗浄した後、第二抗体として 2000倍希釈したベルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体(ダコ社製)を添加し、室温で 1 時間放置した。

該膜をTween-PBSでよく洗浄した後、ECL kit（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて検出した。コントロール抗体として抗マウスMT 4-MM Pモノクローナル抗体KM 2561および抗FLAGモノクローナル抗体（M 2； EASTMAN KODAK COMPANY社）を10 μg/mLで反応させ、同様に検出した。

図9に示す様に抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体（KM2655、KM2658）はヒトMT5-MMP蛋白質の分子量に相当する66Kダルトン付近のバンドに特異的に反応した。

### (3) 蛍光抗体法（フローサイトメトリー）によるヒトMT5-MMPの検出

上記（1）記載の方法に従い遺伝子導入したCOS-1細胞及び無処置COS-1細胞をビベッティングにより回収した。PBSで洗浄した後、細胞膜の抗体透過性を上げるため、100%メタノール（氷冷）で4℃で10分間処理した。PBSで洗浄後、10%正常ウサギ血清にて4℃で30分間ブロッキングした。1×10<sup>5</sup>個/チューブで分注した後、遠沈して上清をぬき、抗ヒトMT5-MM Pモノクローナル抗体の培養上清を加えて4℃で30分間反応させた。PBSで洗浄後、FITC標識抗マウスイムノグロブリン抗体（マウスイムノグロブリンに特異的なもの；和光純薬）を30倍希釈100 μL/チューブで分注し、4℃、30分遮光反応させた。よくPBSで洗浄した後、セルアナライザー（コールター社；EPICS XLsystem II）にて解析した。コントロール抗体として抗FLAGモノクローナル抗体あるいは抗G-CSF誘導体モノクローナル抗体KM511を10 μg/mLで反応させ、同様に検出した。

図10～図12に示したように、化合物3より得られたKM2648、KM2652～2655および化合物5より得られたKM2658はCOS-1細胞発現ヒトMT5-MMPを特異的に検出した。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

### 配列表フリー テキスト

配列23：MT5-MMPの部分アミノ酸配列、Xaa=N<sup>a</sup>-アセチルプロリン  
配列24：MT5-MMPの部分アミノ酸配列、Xaa=N<sup>a</sup>-アセチルヒスチジン

配列 25 : M T 5 - M M P の部分アミノ酸配列、 Xaa=N<sup>a</sup>-アセチルロイシン

配列 26 : M T 5 - M M P の部分アミノ酸配列

配列 27 : M T 5 - M M P の部分アミノ酸配列

配列 28 : F L A G エピトープ

#### 産業上の利用可能性

本発明により得られる新規ポリペプチド M T 4 - M M P (2)の抗体を用いることにより、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織障害、白血球の浸潤を伴う炎症等の疾患の診断、予防、治療が可能となる。

また、本発明により得られる新規ポリペプチド M T 5 - M M P の抗体を用いることにより、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織障害、白血球の浸潤を伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍等の疾患の診断、予防、治療が可能となる。

## 請求の範囲

1. 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
2. 請求項1記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。
3. 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
4. 請求項3のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。
5. 配列番号5記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
6. 請求項5記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。
7. 配列番号6記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
8. 請求項7記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。
9. 請求項1から8のいずれか1項に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。
10. 免疫学的検出法が、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法、放射性物質標識免疫抗体法、免疫組織化学染色法、ウェスタンプロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法およびサンドイッチELISA法から選ばれる免疫学的検出法である、請求項9記載の免疫学的検出法。
11. 請求項1から8のいずれか1項に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫学的定量法。
12. 免疫学的定量法が、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法、放射性物質標識免疫抗体法、免疫組織化学染色法、ウェスタンプロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法およびサンドイッチELISA法から選ばれる免疫学的検出法である、請求項11記載の免疫学的定量法。

13. 請求項1から4のいずれか1項に記載の抗体を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

14. 請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項1から4のいずれか1項に記載の抗体を用いて該ポリペプチド量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

15. 請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、請求項1から4のいずれか1項に記載の抗体が該ポリペプチドに結合できる量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法。

16. 請求項14または15記載の方法で得られた化合物を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

17. 請求項5から8のいずれか1項に記載の抗体を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

18. 請求項5から8のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項5から8のいずれか1項に記載の抗体を用いて該ポリペプチド量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

19. 請求項5から8のいずれか1項に記載のポリペプチドと被験試料とを接触

させ、請求項 5 から 8 のいずれか 1 項に記載の抗体が該ポリペプチドに結合できる量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法。

20. 請求項 18 または 19 記載の方法で得られた化合物を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

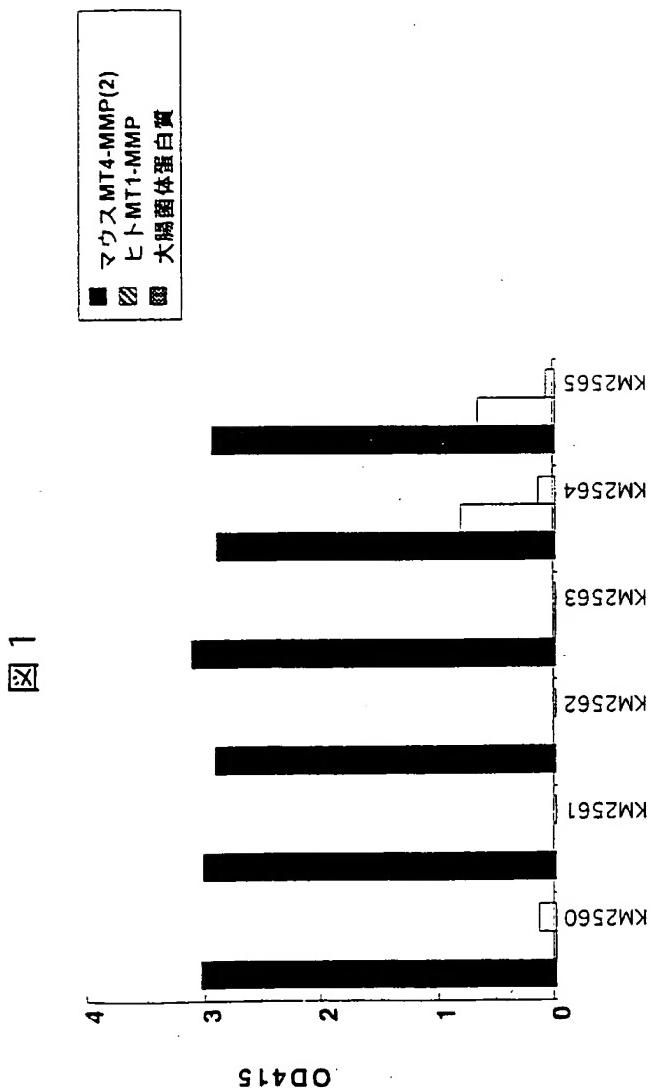
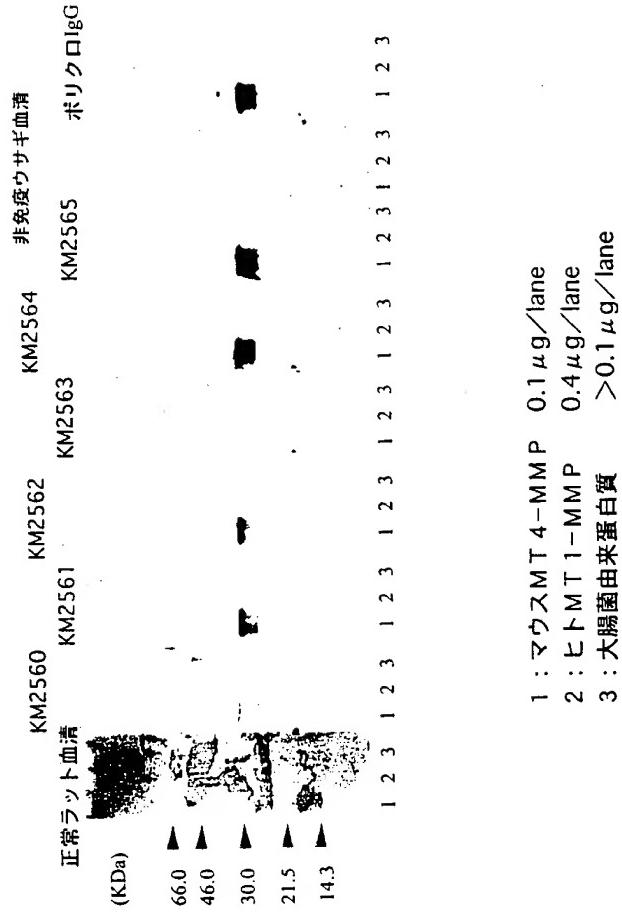


図2 ウエスタンプロットティング



- 1 : マウスMT 4-MMP     $0.1 \mu\text{g}/\text{lane}$
- 2 : ヒトMT 1-MMP     $0.4 \mu\text{g}/\text{lane}$
- 3 : 大腸菌由来蛋白質     $>0.1 \mu\text{g}/\text{lane}$

## 図 3

ヒト MT4-MMP (2) 遺伝子  
導入を行った COS-1 細胞

COS-1 細胞

KM2561



KM2562



KM1764



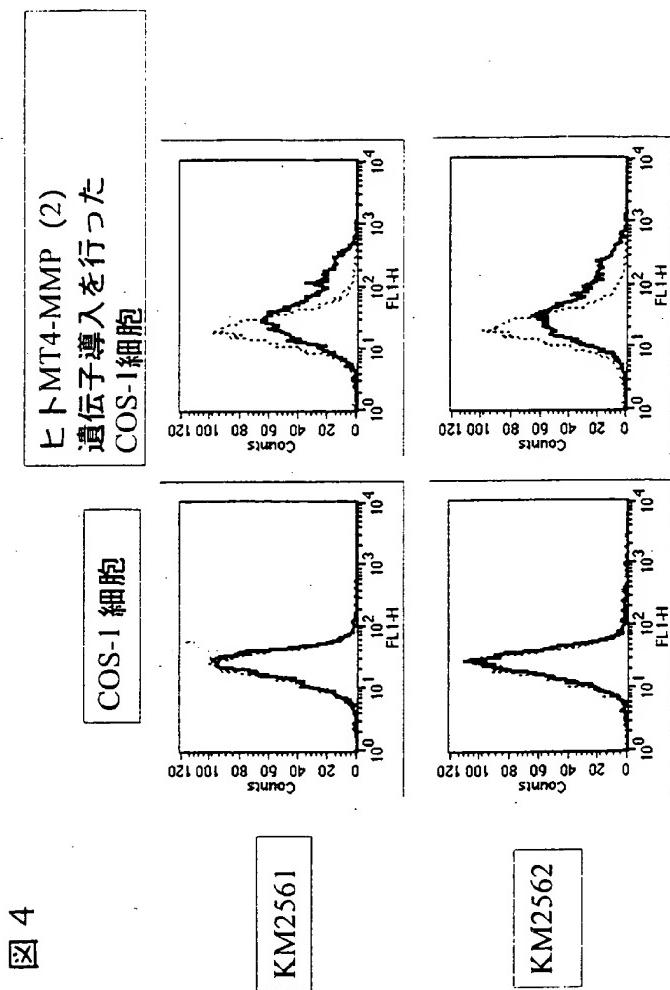
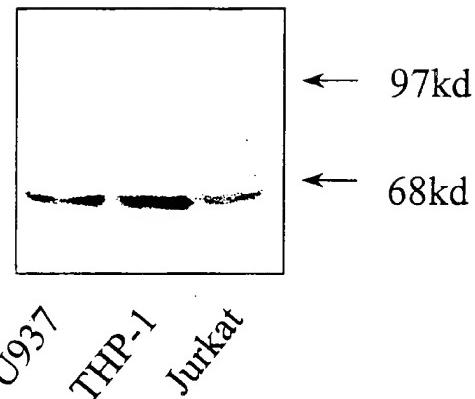


図 4

図 5



human MT1-MMP	1	----MSPAP-----RP-----	----SRCLLPL-LLTGTLAISLGQS-----	----SSFSPEAWLQQVGYLPPGD-----	49
human MT2-MMP	1	----MGSDPSAAGPGRWT-----	----GSLLCDREAAARPRRPL-LIVLVLGCLGLGVAEED-----	----AEVHAENRLRLYGLPQPS-----	67
human MT3-MMP	1	-MILLITFSTGRRLDFVH-----	----HSCOVFFELT-LIWLICATVCC-----	----TEQYFNEVWILQQXGYLPPTD-----	57
human MT4-MMP(2)	1	MRRARARGPGP-PGP-----	----GSLRPLPLPLLALLTRGCCAEPAR-----	----RAEDLSGVETWLSREGYLPPAD-----	69
human MT5-MMP	1	----MFRSRCGGAACGCPPPPGAPWNSRWRVPCGRILL-LIPALCCLAAAGACKPAG-----	----RAEADFAQCNWIKSYGYLLPYE-----	95	
mouse MT5-MMP	1	----MFRSRCGGAACGCPPPPGAPWNSRWRVPCGRILL-LIPALCCLAAAGACKPAG-----	----ADAPFAQCNWIKSYGYLLPYE-----	68	
		*	*	***	***
human MT1-MMP	50	1RHTHTQRSPQSLSAAIAAQKTFYGLQVTGKADADTAKAMNRRPGCPDIFGAEKIAVNR--	KRYA1QGGLWQHNE1TCIONYT--PKVGEAYTEAIR-----	145	
human MT2-MMP	68	RIMSTMRSAQILASALAAENQRFYGIPVTVGLDIEETKEWKKPRCPGPDQFGVRVIANIIRRREKRYVLTJORKVNINHHLTHS1NYT--EKIGWTHSMEA VR-----	EKGWTHSMEA VR-----	165	
human MT3-MMP	58	PMSVLRSAETQOSAIAAMQQFQGINIMTGVNDNTIDWKKPRCPGPDOTRGSSKFHIRR--KRYVLTQCKWQHQHHTYTSIRVNT--PKVGDPETRKAIR-----	PKVGDPETRKAIR-----	153	
human MT4-MMP(2)	70	PTTGQLQTOEELSKATIAMQQFQGLFATGLIDEATIALMKTCSLPDLPVLTQ--ARR--RQQAPATPKWNKRNLSRSPVRVFPDRSPGHDTYRALMY-----	ARR--RQQAPATPKWNKRNLSRSPVRVFPDRSPGHDTYRALMY-----	164	
human MT5-MMP	96	SRSALHSAKALOSAVSTHQQFYG1PVTVGLDQTTIEMWKKPRCPGPDAPHLSR--RRRN--KRYVLTQCKWQHQHHTYTSIRVNT--PKVGDPETRKAIR-----	PKVGDPETRKAIR-----	189	
mouse MT5-MMP	69	SRSALHSKVALOSAVSTHQQFYG1PVTVGLDQTTIEMWKKPRCPGPDAPHLSR--RRRN--KRYVLTQCKWQHQHHTYTSIRVNT--PKVGDPETRKAIR-----	PKVGDPETRKAIR-----	162	
		*	*	***	***
human MT1-MMP	146	KAFRVWEASATPLRFREVPIAY1REGHEKQADIMIFFAEFGHGDSTPFDGGFLAIAAYFPGPN-1GGDTHFDSAEPWTVRNEDNGNDI1EVAVHELGHA-----	244		
human MT2-MMP	166	RAFRVWEQATPLVYFQEVPYEDIIRURROEADIMWLFASGFHGDSSPFDGGFLAIAAYFPGP6-1GGDTHFDEDPWTVSTSTOLIGNL1EVAVHELGHA-----	264		
human MT3-MMP	154	RAFDVWVQNPVPLTFEEVPIYSELENGK-RDVIDT1IIFASGRFGDSSPFDGGFLAIAAYFPGP6-1GGDTHFDSDEPWTVLPHNHDGNDL1EVAVH ELGHA-----	251		
human MT4-MMP(2)	165	TAD1Q1DPSKADINDGCPFDARR--TAD1Q1DPSKADINDGCPFDARR--AGS--TAD1Q1DPSKADINDGCPFDARR--TAD1Q1DPSKADINDGCPFDARR--TAD1Q1DPSKADINDGCPFDARR-----	255		
human MT5-MMP	190	QAFDWVWQKVTPVPLTFEEVPIYHESDR-KEADIMWLFASGFHGDSSPFDGGFLAIAAYFPGP6-1GGDTHFDSDEPWTVLGNANHDGNDL1EVAVH ELGHA-----	287		
mouse MT5-MMP	163	QAFDWVWQKVTPVPLTFEEVPIYHESDR-KEADIMWLFASGFHGDSSPFDGGFLAIAAYFPGP6-1GGDTHFDSDEPWTVLGNANHDGNDL1EVAVH ELGHA-----	260		
		*	*	***	***
human MT1-MMP	245	LGLEHSSDPSA1MAPFYQWMDTE--NFVLPDDDRGIQQLYGGESG-----FPTKMPQP-----RTTSRSPVPDFPKNP-----	312		
human MT2-MMP	265	LGLEHSSRNP1A1MAPFYQWMDV--NFLKLPEDD1LRG1QQLYGTGDPQGPQTQPLPTVTPRPG-----RDPDHRRPRPPQPPPQGPKRPPKPGPPVQPR-----	357		
human MT3-MMP	252	LGLEHSSDPTA1MAPFYQWMD-----NFLKLPEDD1LRG1QQLYGTGDPQGPQTQPLPTVTPRHS1PPDPK1PPPTRPLPTVPHRS1PPDPK1PPPTRPLPTVTPRPG-----	331		
human MT4-MMP(2)	256	IGLSHVAAAHIS1MRPY1QGP1GP1PLR1PLP1DYKVRWQLYGWESVSTTAQ--PEEPPLPE--PDPNNSAAPRD-----	329		
human MT5-MMP	288	IGLEHSSDPSA1MAPFYQWMDT--NFLKLQDLDLQG1QK1YGPAAPELPTPL1PT1PVVR1HSPE-RKHEQPRPRPPLGD-----	368		
mouse MT5-MMP	261	IGLEHSSDPSA1MAPFYQWMDT--NFLKLQDLDLQG1QK1YGPAAPELPTPL1PT1PVVR1HSPE-RKHEQPRPRPPLGD-----	341		
		***	***	***	***

human MT1-MRP	313	-----TYGPNCGDNFTYAMLRGAEFVFKWHRVYRINQ--WMDGYPAPIQEFKRGPLP--ASINTAYER-KDGKFVWFFKGDKIWNFEDASLFGCPKP	401	-----	-----	-----	-----
human MT2-MRP	358	ATERPDIQGPNCGDNFTYAMLRGAEFVFKWHRVYRINR--VLYNMPAPICHEFWRGPB--GDISAAVER-QDGRFVFFKGDKIWNFEDASLFGCPKP	452	-----	-----	-----	-----
human MT3-MRP	332	-RESPYCGAKPNICGDNFTIALLRMENAFVFKWHRVYRINR--WMDGYPAPIQEFKRGPLP--PSDAYEN-SDGNEVIFKGKRYWWFKDTTLQGPYH	425	-----	-----	-----	-----
human MT4-MRP(2)	330	-----VPHRCSTHDAVQI RGEAFFFKGKFWHL TDRHLVSLQAPQMRWVYRINR--VQEGYPHQI QEFQFKGLP--ARIDAYER-ADGRFVFFKGDKIWNFEDASLFGCPKP	421	-----	-----	-----	-----
human MT5-MRP	369	-RSPITCGAKPNICGDNFTIALRGEAFFFVFKWHRVYRINR--VQEGYPHQI QEFQFKGLP--ARIDAYER-ADGRFVFFKGDKIWNFEDASLFGCPKP	462	-----	-----	-----	-----
mouse	342	-RSPITCGAKPNICGDNFTIALRGEAFFFVFKWHRVYRINR--VQEGYPHQI QEFQFKGLP--ARIDAYER-ADGRFVFFKGDKIWNFEDASLFGCPKP	435	-----	-----	-----	-----

human	M1-MAP	402	HIELERGLGLPTDKI DAALFWMPNCKTYYFRGNNYRNEELRAVSEYYPNKIVWEGIPESPGSTMGSDEVFTYFVKGNKWKFFNNQKLKVEPGYPSA	501
human	M2-MAP	453	P1TSYGLPYDRIDTAIWEPTGHTIFFQEDPYPPIPISWGACIPASPGAFILSNDAAITYFVKGTKYKWFDNIELRMEPGYPSI	552
human	M3-MAP	426	DLITLGSGIIPGGGIDAFSAWHDIDTRPDTYFVKTGKREYWWFKFNNQI1LAVEPGYPSI	525
human	M4-MAP(2)	422	PVSDFGLPREGIDTAAWHDIDTRPDTYFVKDGRWPKGIPSPGIPSTLDAAIRWWSKGDFEYKWLDCGELEVAGPYQST	518
human	M5-MAP	463	SIGELGSCLPREGIDTAAWHDIDTRPDTYFVKDGRWPKGIPSPGIPSTLDAAIRWWSKGDFEYKWLDCGELEVAGPYQST	562
mouse	M1-MAP	436	SIGELGSCLPREGIDTAAWHDIDTRPDTYFVKDGRWPKGIPSPGIPSTLDAAIRWWSKGDFEYKWLDCGELEVAGPYQST	535

human MT1-MNP	502	LRDMMGCPSSGPDE	-----	GTEEEVTE11IEVEDE	-----	EGGG-----	AVSAAVLPV1.LLL.VLAVGLAVFFRRH	565
human MT2-MNP	553	LRDMMGCGENIEVPGRPDPWARPFPNPGGAEPSADALECGDVGCGDFGAGVNKGDSRYYQMEEVARTVNVWVLPV1.LLICVIGLYA1QMQRK	652	-----	-----	-----	-----	-----
human MT3-MNP	526	LRDMMGCDG-PTDVKYKEGH	-----	SPPDDIVIKLDNTAS	-----	-----	TVA1A1VPC1LAICL1VLYTTFVFKR	590
human MT4-MNP (2)	519	ALRDVLCGDSQASGPVAAVDAE	-----	GPRAQGQDMS1SEGYCVC	-----	-----	SCTSGASSPPGAPGVATM1.LLPP-----	590
human MT5-MNP	563	LRDMMGCKOKVVERKER	-----	LPQDDVWMT1NUVPG	-----	-----	SVNAAVWV1.PCL.SIC14.VLYT1FEPFRK	628
mouse MT5-MNP	536	LRDMMGCKOKVVERKER	-----	LPQDDVWMT1NUVPG	-----	-----	SVNAAVWV1.PCL.SIC14.VLYT1FEPFRK	601

human	M1-MMP	566	GTPRLLYCQRSLLDKV	582
human	M2-MMP	653	GAPRVLLYCKRSIQLQEWP	669
human	M3-MMP	591	GTPHILLYCKRSQMGEWP	607
human	M4-MMP(2)	591	LSPGALNTAAQALTLL--	605
human	M5-MMP	629	TGPQFVTVYKPVQEWP	645
human	M6-MMP	629	TGPQFVTVYKPVQEWP	645

## 図 6 のつづき

図 7

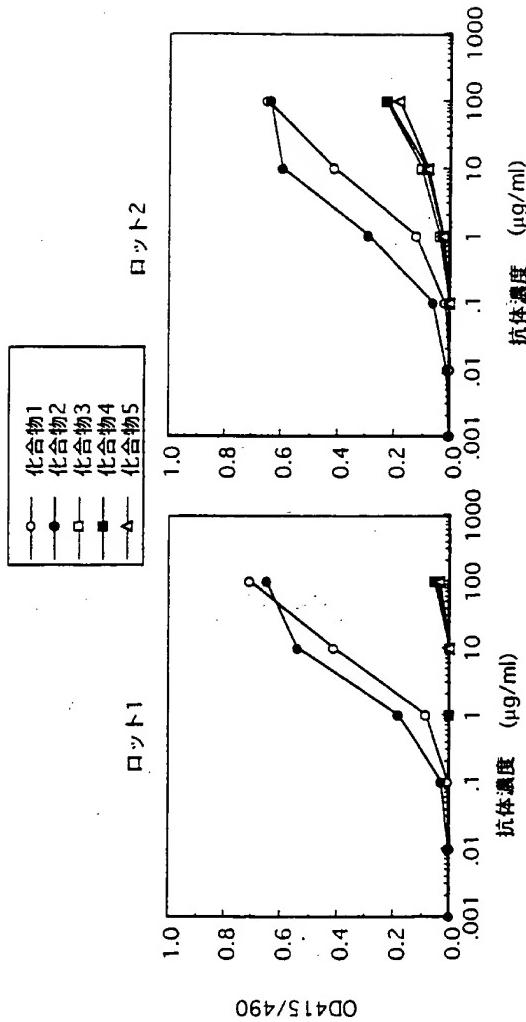
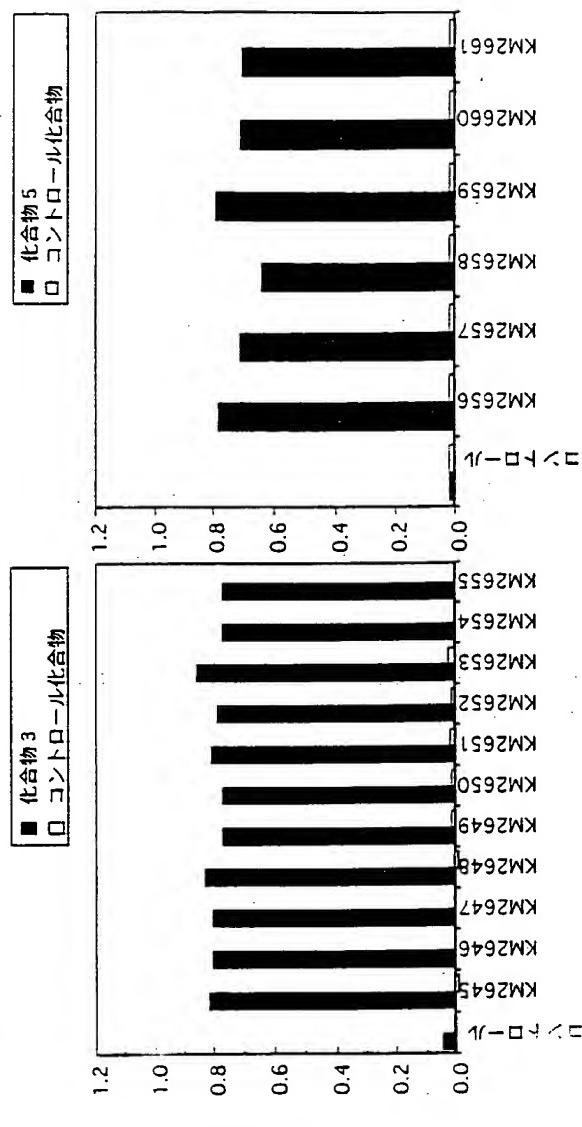


図 8



OD 415/490

8/12



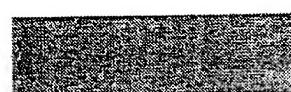
KM2658



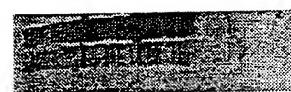
KM2655



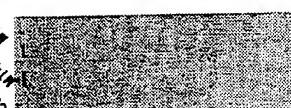
anti MT4-MMP MoAb KM2561

9  
☒

control Ab (rat Ig G1)



anti FLAG MoAb

C85-1  
MT4-MMP/MMP10CS-1

control Ab (mouse Ig G1)

270k 97.4k 65k 46k 30k 21.5k 14.3k

図 10

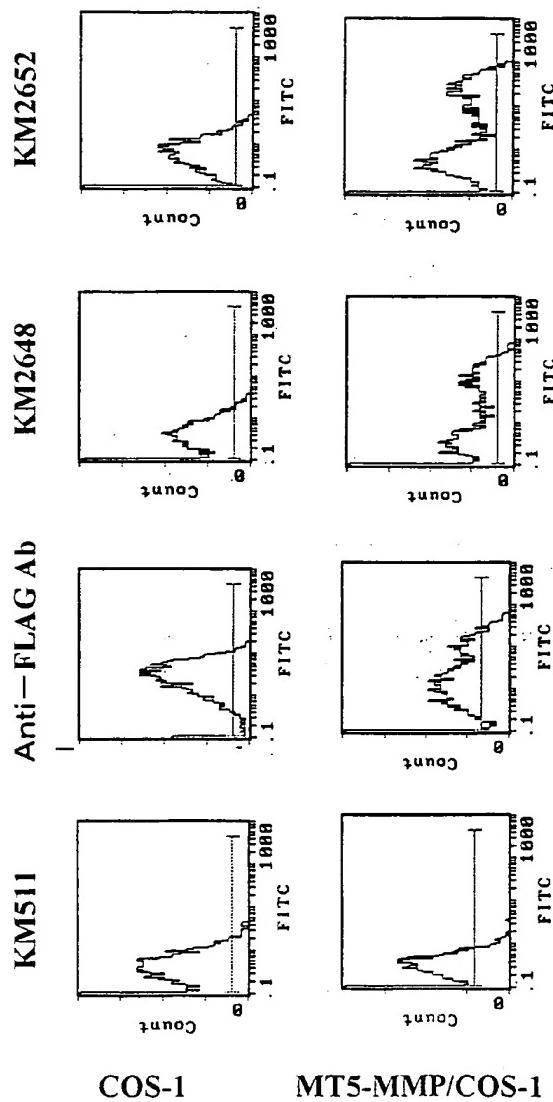


図 11

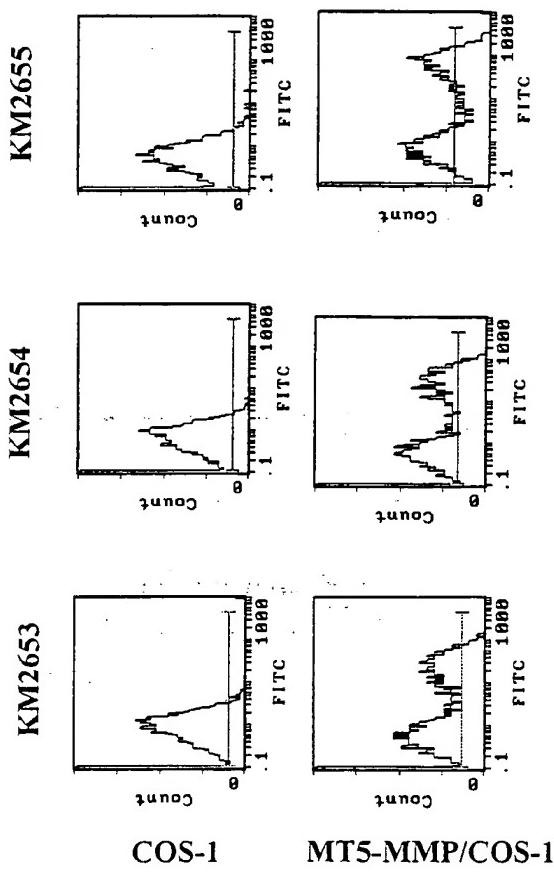
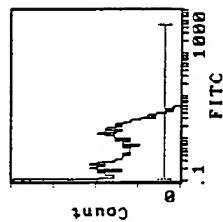
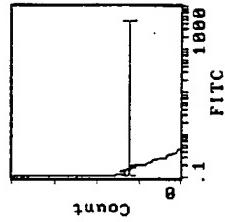
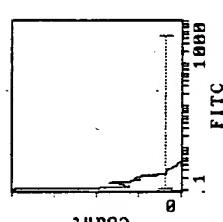
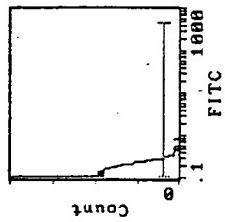


図 12

KM2658



KMS11



COS-1

MT5-MMP/COS-1

## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> NOVEL ANTIBODY, MEDICAMENT COMPRISING SAID ANTIBODY, AND METHOD OF SCREENING COMPOUNDS USING SAID ANTIBODY

<130> PH-669-PCT

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 587

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Gly Arg Arg Pro Arg Gly Pro Gly Ser Pro Arg Gly Pro Gly Pro

1 5 10 15

Pro Arg Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro Leu Leu Leu Val Leu Ala Leu

20 25 30

Ala Ala His Gly Gly Cys Ala Ala Pro Ala Pro Arg Ala Glu Asp Leu

35 40 45

Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala

50 55 60

Asp Pro Ala Ser Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu Ser Lys Ala

65 70 75 80

Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Thr Thr Gly Ile Leu

85 90 95

Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro

100 105 110

Asp Leu Pro Pro Gly Ala Gln Ser Arg Arg Lys Arg Gln Thr Pro Pro

115 120 125

Pro Thr Lys Trp Ser Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe

130 135 140

Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly Arg Asp Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr

145 150 155 160

Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Thr Pro Leu Asn Phe His Glu

165 170 175

Val Ala Gly Asn Ala Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp

180 185 190

His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Gly Thr Val Ala His

195

200

205

Ala Phe Phe Pro Gly Asp His His Thr Ala Gly Asp Thr His Phe Asp

210

215

220

Asp Asp Glu Pro Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His Gly Met Asp

225

230

235

240

Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile Gly Leu Ser

245

250

255

His Val Ala Ala Pro Ser Ser Ile Met Gln Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro

260

265

270

Val Gly Asp Pro Val Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp Arg Val Arg

275

280

285

Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln

290

295

300

Leu Asp Thr Pro Glu Pro Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro

305

310

315

320

Asn Asn Arg Ser Ser Thr Pro Pro Gln Lys Asp Val Pro His Arg Cys

325

330

335

Thr Ala His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe

340

345

350

Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val

355                   360                   365

Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu

370                   375                   380

His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys

385                   390                   395                   400

Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn

405                   410                   415

Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro

420                   425                   430

Gly Gly Ile Asp Ala Val Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr

435                   440                   445

Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg Arg

450                   455                   460

Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Gly Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro

465                   470                   475                   480

Ser Met Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe

485                   490                   495

Phe Arg Gly Gin Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Ala

500                   505                   510

Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly

515

520

525

Glu Pro Leu Ala Asp Ala Glu Asp Val Gly Pro Gln Gly Arg

530

535

540

Ser Gly Ala Gln Asp Gly Leu Ala Val Cys Ser Cys Thr Ser Asp Ala

545

550

555

560

His Arg Leu Ala Leu Pro Ser Leu Leu Leu Leu Thr Pro Leu Leu Trp

565

570

575

Gly Leu Trp Thr Ser Val Ser Ala Lys Ala Ser

580

585

<210> 2

<211> 605

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Arg Arg Ala Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Pro

1

5

10

15

Gly Leu Ser Arg Leu Pro Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu

20

25

30

Ala Leu Gly Thr Arg Gly Gly Cys Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Arg

35

40

45

Ala Glu Asp Leu Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr

50

55

60

Leu Pro Pro Ala Asp Pro Thr Thr Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu

65

70

75

80

Leu Ser Lys Ala Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Ala

85

90

95

Thr Gly Ile Leu Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg

100

105

110

Cys Ser Leu Pro Asp Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg

115

120

125

Gln Ala Pro Ala Pro Thr Lys Trp Asn Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg

130

135

140

Val Arg Thr Phe Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly His Asp Thr Val Arg

145

150

155

160

Ala Leu Met Tyr Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Ala Pro Leu

165

170

175

Asn Phe His Glu Val Ala Gly Ser Thr Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe

180

185

190

Ser Lys Ala Asp His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Ala Arg Arg His  
195 200 205

Arg Ala His Ala Phe Phe Pro Gly His His His Thr Ala Gly Tyr Thr  
210 215 220

His Phe Asn Asp Asp Glu Ala Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His  
225 230 235 240

Gly Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile  
245 250 255

Gly Leu Ser His Val Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr Tyr  
260 265 270

Gln Gly Pro Val Gly Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp  
275 280 285

Lys Val Arg Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro  
290 295 300

Thr Ala Gln Pro Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp Asn  
305 310 315 320

Arg Ser Ser Ala Pro Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser Thr  
325 330 335

His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys  
340 345 350

Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu

355 360 365

Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu

370 375 380

Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val

385 390 395 400

Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu

405 410 415

Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly

420 425 430

Ile Asp Ala Ala Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe

435 440 445

Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met Asp

450 455 460

Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Thr

465 470 475 480

Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg

485 490 495

Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala Pro

500

505

510

Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp Ser

515

520

525

Gln Ala Asp Gly Ser Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly Pro

530

535

540

Arg Ala Pro Pro Gly Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly Tyr

545

550

555

560

Glu Val Cys Ser Cys Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala Pro

565

570

575

Gly Pro Leu Val Ala Ala Thr Met Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ser

580

585

590

Pro Gly Ala Leu Trp Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu

595

600

605

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 3517

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (86)..(1846)

&lt;400&gt; 3

ggcacgaggg cgccggagccg agcgaggcgc ggagctggct gctggcgggt gcggggaccc 60

tcgccacccg acctgggaga gcggg atg gga cgc cgc ccg cgg gga cct ggg 112

Met Gly Arg Arg Pro Arg Gly Pro Gly

1 5

tcc ccc cgg gga cct ggc cct cca cgc ccc ggg ccg ggg ctg cca cca 160

Ser Pro Arg Gly Pro Gly Pro Pro Arg Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro

10 15 20 25

ctg ctg ctt gta ctg gcg ctg gcg gcc cat ggg ggc tgc gca gcg ccc 208

Leu Leu Leu Val Leu Ala Leu Ala Ala His Gly Gly Cys Ala Ala Pro

30 35 40

gcg ccc cgc gcg gag gac ctc agc ctc ggg gtg gag tgg cta agc agg 256

Ala Pro Arg Ala Glu Asp Leu Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg

45 50 55

ttt ggc tac ctg ccg cct gca gat ccg gca tca ggg cag cta cag acc 304

Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala Asp Pro Ala Ser Gly Gln Leu Gln Thr

60 65 70

cag gag gaa ctg tcc aaa gcg att act gcc atg cag cag ttt ggt ggt 352

Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly

75 80 85

ctg gag acc act ggc atc cta gat gag gcc act ctg gcc ctg atg aaa 400

Leu Glu Thr Thr Gly Ile Leu Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys

90 95 100 105  
acc cct cga tgc tcc ctt ccg gac ctg ccc cct ggg gcc caa tcg aga 448  
Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro Asp Leu Pro Pro Gly Ala Gln Ser Arg

110 115 120  
agg aag cgg cag act cca ccc cca acc aaa tgg agc aag agg aac ctt 496  
Arg Lys Arg Gln Thr Pro Pro Pro Thr Lys Trp Ser Lys Arg Asn Leu  
125 130 135

tct tgg agg gtc cgg aca ttc cca cgg gac tca ccc ctg ggc cgg gat 544  
Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly Arg Asp  
140 145 150

act gtg cgt gca ctc atg tac tac gcc ctc aaa gtc tgg agt gac atc 592  
Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile  
155 160 165

aca ccc ttg aac ttc cac gag gta gcg ggc aac gcg gcg gac atc cag 640  
Thr Pro Leu Asn Phe His Glu Val Ala Gly Asn Ala Ala Asp Ile Gln  
170 175 180 185

atc gac ttc tcc aag gcc gac cac aat gac ggc tac ccc ttc gat ggc 688  
Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly  
190 195 200

cct ggt ggc acg gtg gcc cac gca ttc ttc cct ggt gac cac cac acg 736  
Pro Gly Gly Thr Val Ala His Ala Phe Phe Pro Gly Asp His His Thr  
205 210 215

gca ggg gac acc cac ttt gat gac gag cca tgg acc ttc cgt tcc 784  
Ala Gly Asp Thr His Phe Asp Asp Asp Glu Pro Trp Thr Phe Arg Ser

220 225 230

tca gat gcc cac ggg atg gac ctg ttt gca gtg gcc gtc cat gag ttt 832  
Ser Asp Ala His Gly Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe

235 240 245

ggt cat gcc att ggt ctg agc cat gtt gcc gcc cca agc tcc atc atg 880  
Gly His Ala Ile Gly Leu Ser His Val Ala Ala Pro Ser Ser Ile Met  
250 255 260 265

caa ccg tac tac cag ggc ccc gtg ggt gac ccc gta cgc tat gga ctt 928  
Gln Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro Val Gly Asp Pro Val Arg Tyr Gly Leu  
270 275 280

ccc tat gag gac agg gtg cgt gtc tgg cag ttg tac ggt gtg cgg gaa 976  
Pro Tyr Glu Asp Arg Val Arg Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu  
285 290 295

tcc gtg tcc cct act gcc cag ctg gat acc cca gag ccc gag gag cca 1024  
Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln Leu Asp Thr Pro Glu Pro Glu Pro  
300 305 310

ccc ctc ctg cca gag ccc ccc aac aat cgg tct agc act ccc ccc cag 1072  
Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asn Asn Arg Ser Ser Thr Pro Pro Gln  
315 320 325

aag gac gtg cct cac agg tgc act gcc cac ttt gat gct gtg gcc cag 1120  
Lys Asp Val Pro His Arg Cys Thr Ala His Phe Asp Ala Val Ala Gln

330 335 340 345

att cga ggc gaa gca ttc ttt ttc aaa ggc aag tat ttc tgg agg ctg 1168  
Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu  
350 355 360

acc cgg gac cga cac ttg gtg tcg ctg cag ccg gct caa atg cat cgc 1216  
Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg  
365 370 375

ttc tgg cgg ggc ctg ccg ctg cac ctg gac agt gtg gac gcc gtg tat 1264  
Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr  
380 385 390

gag cgt acc agt gac cac aag att gtc ttc ttc aaa gga gac aga tac 1312  
Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr  
395 400 405

tgg gtg ttt aag gac aac aac gta gag gaa ggg tac ccg cga cct gtc 1360  
Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val  
410 415 420 425

tcc gac ttc agc ctc ccg cca ggt ggc atc gat gct gtc ttc tcc tgg 1408  
Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Val Phe Ser Trp  
430 435 440

gcc cac aat gac agg act tat ttc ttt aag gac cag ctg tac tgg cgc 1456

Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg

445

450

455

tat gat gac cac aca cgg cgc atg gac cct ggc tac cct gcc cag gga 1504  
Tyr Asp Asp His Thr Arg Arg Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Gly

460

465

470

ccc ctg tgg aga ggt gtc ccc agc atg ttg gat gat gcc atg cgc tgg 1552  
Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Met Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp  
475 480 485

tct gat ggt gca tcc tat ttc ttc cga ggc cag gag tac tgg aaa gtg 1600  
Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val  
490 495 500 505

ctg gat ggc gag ctg gaa gca gcc ccc ggg tac cca cag tct aca gcc 1648  
Leu Asp Gly Glu Leu Glu Ala Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala  
510 515 520

cgc gac tgg ctg gta tgc ggt gag ccg ctg gcg gat gcg gag gat gta 1696  
Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Glu Pro Leu Ala Asp Ala Glu Asp Val  
525 530 535

ggg cct gga ccc cag ggc cgc agt ggg gcc caa gat ggt ctg gca gta 1744  
Gly Pro Gly Pro Gln Gly Arg Ser Gly Ala Gln Asp Gly Leu Ala Val  
540 545 550

tgt tcc tgc act tca gac gca cac agg ttg gca ctg cca tct ctg ctg 1792  
Cys Ser Cys Thr Ser Asp Ala His Arg Leu Ala Leu Pro Ser Leu Leu

555

560

565

ctt ctg act cca ctg ctg tgg ggc ctg tgg acc tca gtc tct gcc aag 1840  
Leu Leu Thr Pro Leu Leu Trp Gly Leu Trp Thr Ser Val Ser Ala Lys  
570 575 580 585

gca tcc tgagggcagt gctaggccttg cggatcaagg agccagggga gcagggacac 1896  
Ala Ser

actggccagt actcagcagg acttgtgtc caagcttccg gtcccctcgct ctttccttcc 1956

tcccttcctt gaacctcaggg gtgctgtgcc atctgctgg a gggctccca gctgggacag 2016

gacgtcccac caagggcatac catgcacacc ttgcctacct ggagcagcca taggcagtc 2076

cccttccttc ctctgcacat cacgctgctt cggtgcacct tgccggcgt cccaaaggcca 2136

gctgtcacaa cccccaggatg ctttgtctgc acctgagcgg ctctgatggc atctgcacgt 2196

gggctgtatga ggggcaaaca ggggttccctc gtggtatccg taggggcccac catgcctgtt 2256

tcacaagtaa gagatgtatgat gccccgatgg ggaaacaggg tggagaaaag gcacctaccc 2316

agaagtctga tccactgccc tttgcagcag ccagcgcgt atctgctggg ataggggacc 2376

agtacacactc aggatctgcc cacagattcc cagatgtgg caagggccct tgctccaact 2436

accaggagca cagccacactc tccccgtccat agataggtta gcatggagg ctgtgtcctg 2496

ttatctccct ctcttggcc aggagagcat tggggcttc cctcggtgc tttgatggg 2556

ggtgtggggc gcccatagag atatttcttc atctgtcagt acccatgtc tcagcaagat 2616

gccccatata gtttctggcc tggatccctg cagcttggac tcacagctgt cccctcccc 2676

gctgcagaag ggcttctaacc acctggaaata aagggtggcgttccatggatgg 2736

tggttgggg agcccagggt gatagcaagg gggagctgca gggataagtgc tcagggtcct 2796

cggggagtca tgacaatgtt accgcctaacc ttggagatgtt agggactgtc cacggattgc 2856

ttctctgggt gacaaacctc catggtccag aaaggggttg aggttgaacc caagatgggt 2916

taatgagctc cagaaaggaa cagccaaggttt caaaagggttccatggacaagac gggccctggagg 2976

aacagggcca cccaggttagg cgtggctgtt gggtaaggcag ttctgtcat tggcacgag 3036

atgaaaatta gtgatcacac gcacataccccc ccctccccaa ctggcccggt cccatctcag 3096

gtaagaaagg ttctgtcta cccagggcca ggttttagtgc ttgtcaggat gagtgagcag 3156

ctagcggggc ctaagtttctt accctccatt tcccaagccctt ggccacaccc tagaccctgt 3216

tcagactagg caggacagag tcaggggttag gggcatctga ggtttccctgt tcttggaaac 3276

caccctactc tgccctcata taaaaggcactg ctccatgtatgtt gtcaccac 3336

ctgcaggaca cagatgtcctt atacagcaac agggaaatgc caaaaaatctt tgcacatag 3396

cactgaaaac cagacccgca ggctggagct gtcttagatgc tggtgtcaca ctcattttaa 3456

aacctaaact cttataaaaa attttgtaca ctggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3516

a 3517

<210> 4

<211> 2423

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (100)..(1914)

<400> 4

ccggcgcccc cgccgcggag agcggagggc gcccggctgc ggaacgcgaa gcggaggcg 60

cgggaccctg cacgcccccc gccccccat gtgagcgcc atg cgg cgc cgc gca 114

Met Arg Arg Arg Ala

1

5

gcc cgg gga ccc ggc cgg ccc cca ggg ccc gga ctc tcg cgg ctg 162

Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Pro Gly Leu Ser Arg Leu

10

15

20

ccg ctg ctg ccg ctg ccg ctg ctg ctg ctg gcg ctg ggg acc cgc 210

Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Thr Arg

25	30	35
ggg ggc tgc gcc gcg ccg gaa ccc gcg cgg cgc gcc gag gac ctc agc    258		
Gly Gly Cys Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Asp Leu Ser		
40	45	50
ctg gga gtg gag tgg cta agc agg ttc ggt tac ctg ccc ccg gct gac    306		
Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala Asp		
55	60	65
ccc aca aca ggg cag ctg cag acg caa gag gag ctg tct aag gcc atc    354		
Pro Thr Thr Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala Ile		
70	75	80
85		
aca gcc atg cag cag ttt ggt ggc ctg gag gcc acc ggc atc ctg gac    402		
Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Ala Thr Gly Ile Leu Asp		
90	95	100
gag gcc acc ctg gcc ctg atg aaa acc cca cgc tgc tcc ctg cca gac    450		
Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro Asp		
105	110	115
ctc cct gtc ctg acc cag gct cgc agg aga cgc cag gct cca gcc ccc    498		
Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Gln Ala Pro Ala Pro		
120	125	130
acc aag tgg aac aag agg aac ctg tcg tgg agg gtc cgg acg ttc cca    546		
Thr Lys Trp Asn Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe Pro		
135	140	145

cg<sup>g</sup> gac tca cca ctg ggg cac gac acg gtg cgt gca ctc atg tac tac 594  
Arg Asp Ser Pro Leu Gly His Asp Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr Tyr

150 155 160 165

gcc ctc aag gtc tgg agc gac att g<sup>c</sup>g ccc ctg aac ttc cac gag gtg 642  
Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Ala Pro Leu Asn Phe His Glu Val

170 175 180

g<sup>c</sup>g ggc agc acc gcc gac atc cag atc gac ttc tcc aag gcc gac cat 690  
Ala Gly Ser Thr Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp His

185 190 195

aac gac ggc tac ccc ttc gac gcc cgg cac cgt gcc cac gcc ttc 738  
Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Ala Arg Arg His Arg Ala His Ala Phe

200 205 210

ttc ccc ggc cac cac acc gcc ggg tac acc cac ttt aac gat gac 786  
Phe Pro Gly His His Thr Ala Gly Tyr Thr His Phe Asn Asp Asp

215 220 225

gag gcc tgg acc ttc cgc tcc tgg gat gcc cac ggg atg gac ctg ttt 834  
Glu Ala Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His Gly Met Asp Leu Phe

230 235 240 245

gca gtg gct gtc cac gag ttt ggc cac gcc att ggg tta agc cat gtg 882  
Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile Gly Leu Ser His Val

250 255 260

gcc gct gca cac tcc atc atg cgg ccg tac tac cag ggc ccg gtg ggt 930  
Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr Tyr Gin Gly Pro Val Gly

265 270 275

gac ccg ctg cgc tac ggg ctc ccc tac gag gac aag gtg cgc gtc tgg 978  
Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp Lys Val Arg Val Trp

280 285 290

cag ctg tac ggt gtg cgg gag tct gtg tct ccc acg gcg cag ccc gag 1026  
Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln Pro Glu

295 300 305

gag cct ccc ctg ctg cgg gag ccc cca gac aac cgg tcc agc gcc ccg 1074  
Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp Asn Arg Ser Ser Ala Pro  
310 315 320 325

ccc agg aag gac gtg ccc cac aga tgc agc act cac ttt gac gcg gtg 1122  
Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser Thr His Phe Asp Ala Val

330 335 340

gcc cag atc cgg ggt gaa gct ttc ttc aaa ggc aag tac ttc tgg 1170  
Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp  
345 350 355

cgg ctg acg cgg gac cgg cac ctg gtg tcc ctg cag ccg gca cag atg 1218  
Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met

360 365 370

cac cgc ttc tgg cgg ggc ctg ccg ctg cac ctg gac agc gtg gac gcc 1266

His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp Ala

375

380

385

gtg tac gag cgc acc agc gac cac aag atc gtc ttc ttt aaa gga gac 1314

Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp

390

395

400

405

agg tac tgg gtg ttc aag gac aat aac gta gag gaa gga tac ccg cgc 1362

Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg

410

415

420

ccc gtc tcc gac ttc agc ctc ccg cct ggc ggc atc gac gct gcc ttc 1410

Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Ala Phe

425

430

435

tcc tgg gcc cac aat gac agg act tat ttc ttt aag gac cag ctg tac 1458

Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr

440

445

450

tgg cgc tac gat gac cac acg agg cac atg gac ccc ggc tac ccc gcc 1506

Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala

455

460

465

cag agc ccc ctg tgg agg ggt gtc ccc agc acg ctg gac gac gcc atg 1554

Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Thr Leu Asp Asp Ala Met

470

475

480

485

cgc tgg tcc gac ggt gcc tcc tac ttc ttc cgt ggc cag gag tac tgg 1602

Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp

490

495

500

aaa gtg ctg gat ggc gag ctg gag gtg gca ccc ggg tac cca cag tcc 1650  
Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser

505

510

515

acg gcc cgg gac tgg ctg gtg tgt gga gac tca cag gcc gat gga tct 1698  
Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp Ser Gln Ala Asp Gly Ser

520

525

530

gtg gct gcg ggc gtg gac gca gag ggg ccc cgc gcc cct cca gga 1746  
Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly Pro Arg Ala Pro Pro Gly

535

540

545

caa cat gac cag agc cgc tcg gag gac ggt tac gag gtc tgc tca tgc 1794  
Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly Tyr Glu Val Cys Ser Cys  
550 555 560 565

acc tct ggg gca tcc tct ccc ccg ggg gcc cca ggc cca ctg gtg gct 1842  
Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Val Ala  
570 575 580

gcc acc atg ctg ctg ctg ccg cca ctg tca cca ggc gcc ctg tgg 1890  
Ala Thr Met Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu Trp  
585 590 595

aca gcg gcc cag gcc ctg acg cta tgacacacag cgcgagccca tgagaggaca 1944  
Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu

600

605

gaggcggtgg gacagcctgg ccacagaggg caaggactgt gccggagtcc ctgggggagg 2004

tgctggcgcg ggatgaggac gggccacctt ggacccggaa ggccagcaga gggcacggcc 2064

cgccaggctt gggcaggctc aggtggcaag gacggagctg tcccctagtg agggactgtg 2124

ttgactgacg agccgagggg tggccgcctcc agaagggtgc ccagtcaggc cgcacccgccc 2184

ccagcctctt ccggccctgg agggagcatc tcgggctggg ggcccacccc tctctgtgcc 2244

ggcgccacca accccaccca cactgctgcc tggtgtcccc gccggcccac agggccctccg 2304

tccccaggctt cccagtgggg cagccctcccc cacagacgag ccccccacat ggtgccgcgg 2364

cacgtcccccc ctgtgacgctt ttccagacca acatgacctc tccctgtctt gtagcggcc 2423

<210> 5

<211> 618

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 5

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Ala Ala Pro Gly Gln Ala Ser Arg

1

5

10

15

Irp Ser Gly Trp Arg Ala Pro Gly Arg Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala

20

25

30

Leu Cys Cys Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Lys Pro Ala Gly Ala

35

40

45

Asp Ala Pro Phe Ala Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu

50

55

60

Leu Pro Tyr Glu Ser Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Gly Lys Ala Leu

65

70

75

80

Gln Ser Ala Val Ser Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr

85

90

95

Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys

100

105

110

Gly Val Pro Asp His Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Arg Asn Lys Arg

115

120

125

Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser

130

135

140

Ile His Asn Tyr Thr Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala

145

150

155

160

Ile Arg Gln Ala Phe Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe

165

170

175

Glu Glu Val Pro Tyr His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp

180

185

190

Ile Met Ile Phe Phe Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe

195 200 205

Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly

210 215 220

Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly

225 230 235 240

Asn Ala Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu

245 250 255

Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Asn Asp Pro Ser Ala Ile

260 265 270

Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro

275 280 285

Gln Asp Asp Leu Gln Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu

290 295 300

Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu His Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile

305 310 315 320

His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg His Pro Arg Pro Pro Arg

325 330 335

Pro Pro Leu Gly Asp Arg Pro Ser Thr Pro Gly Ala Lys Pro Asn Ile

340 345 350

Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe

355 360 365

Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln

370 375 380

Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala

385 390 395 400

Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe

405 410 415

Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly

420 425 430

Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly

435 440 445

Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe

450 455 460

Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp

465 470 475 480

Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gin Ala

485 490 495

Pro Gin Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Phe Tyr

500 505 510

Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gin Lys Leu Ser Val Glu

515 520 525

Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Lys Gln

530 535 540

Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val

545 550 555 560

Asp Ile Met Val Thr Ile Asp Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val

565 570 575

Ala Val Val Val Pro Cys Thr Leu Ser Leu Cys Leu Leu Val Leu Leu

580 585 590

Tyr Thr Ile Phe Gln Phe Lys Asn Lys Ala Gly Pro Gln Pro Val Thr

595 600 605

Tyr Tyr Lys Arg Pro Val Gln Glu Trp Val

610 615

<210> 6

<211> 645

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Pro Pro Pro

1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Gly Gln Ala Pro Arg Trp Ser Arg Trp Arg Val Pro

20 25 30

Gly Arg Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Pro Gly

35 40 45

Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Asn Arg Ala Ala

50 55 60

Val Ala Val Ala Val Ala Arg Ala Asp Glu Ala Glu Ala Pro Phe Ala

65 70 75 80

Gly Gin Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Asp Ser

85 90 95

Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Ala Lys Ala Leu Gin Ser Ala Val Ser

100 105 110

Thr Met Gin Gin Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gin

115 120 125

Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His

130 135 140

Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly

145                   150                   155                   160

Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr  
165                   170                   175

Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe  
180                   185                   190

Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr  
195                   200                   205

His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe  
210                   215                   220

Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly  
225                   230                   235                   240

Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Asp Thr  
245                   250                   255

His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp  
260                   265                   270

Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu  
275                   280                   285

Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr  
290                   295                   300

Gin Tyr Met Gin Thr His Asn Phe Lys Leu Pro Gin Asp Asp Leu Gin  
305                   310                   315                   320

Gly Ile Gin Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr  
325                   330                   335

Arg Pro Leu Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu  
340                   345                   350

Arg Lys His Glu Arg Gin Pro Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp  
355                   360                   365

Arg Pro Ser Thr Pro Gly Thr Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe  
370                   375                   380

Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg  
385                   390                   395                   400

Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gin Glu Gly Tyr Pro Met  
405                   410                   415

Gln Ile Glu Gin Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala  
420                   425                   430

Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr  
435                   440                   445

Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu  
450                   455                   460

Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu  
465 470 475 480

Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr  
485 490 495

Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys  
500 505 510

Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe  
515 520 525

Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr  
530 535 540

Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg  
545 550 555 560

Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg  
565 570 575

Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr  
580 585 590

Ile Asn Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val Ala Val Val Ile Pro  
595 600 605

Cys Ile Leu Ser Leu Cys Ile Leu Val Leu Val Tyr Thr Ile Phe Gln

610 615 620

Phe Lys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro

625 630 635 640

Val Gln Glu Trp Val

645

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 4263

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (75)..(1928)

&lt;400&gt; 7

gcgggaggac cgggccccggag ccggccggcc cgcccgccgccc atcgcagccg ggccggccggg 60

ccccccggccgc cgggg atg ccg agg agc cgg ggc ggc cgc gct gcg ccg ggc 110

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly

1

5

10

cag gcc tcg cgc tgg agc ggc tgg cgg gcc ccg ggg cgg ctg ctg ctg ccg 158

Gln Ala Ser Arg Trp Ser Gly Trp Arg Ala Pro Gly Arg Leu Leu Pro

15

20

25

ctg ctg ccc gcg ctc tgc tgc ctc gcg gcg gcg ggg gcc ggg aag 206

Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Ala Ala Ala Ala Gly Lys

30 35 40

ccg gcc ggg gcg gac gcg ccc ttc gct ggg cag aac tgg tta aaa tca 254

Pro Ala Gly Ala Asp Ala Pro Phe Ala Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser

45 50 55 60

tat ggc tat ctg ctt ccc tat gag tcg cgg gca tct gcg ttg cat tct 302

Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Glu Ser Arg Ala Ser Ala Leu His Ser

65 70 75

ggg aag gcc ttt cag tcc gcg gtc tcc act atg cag cag ttt tac ggg 350

Gly Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly

80 85 90

atc cca gtc acc ggt gtg ttg gat cag aca aca atc gag tgg atg aag 398

Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys

95 100 105

aaa cct cga tgt ggc gtc cct gat cat ccc cac ttg agc agg agg agg 446

Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His Pro His Leu Ser Arg Arg Arg

110 115 120

aga aat aag cga tat gcc cta act gga cag aag tgg agg cag aaa cac 494

Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Arg Gln Lys His

125 130 135 140

atc acc tac agc att cac aat tat acc cca aag gtg ggt gag ctg gac 542

Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp

145                    150                    155  
aca cgg aag gct att cgt cag gct ttc gat gtg tgg cag aag gtg act    590  
Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe Asp Val Trp Gln Lys Val Thr  
160                    165                    170

cca ctg acc ttt gaa gag gtg cca tac cat gag atc aaa agt gac cgg    638  
Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr His Glu Ile Lys Ser Asp Arg  
175                    180                    185

aag gag gca gac atc atg atc ttc ttt gct tct ggt ttc cat ggt gac    686  
Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe Ala Ser Gly Phe His Gly Asp  
190                    195                    200

agc tcc cca ttt gat ggg gaa ggg gga ttc cta gcc cat gcc tac ttt    734  
Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe  
205                    210                    215                    220

cct ggc cca ggg atc gga gga gac act cac ttt gat tca gat gaa ccc    782  
Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp Glu Pro  
225                    230                    235

tgg acg cta gga aat gcc aac cat gat ggc aat gac ctc ttc ctg gtg    830  
Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val  
240                    245                    250

gcc gtg cat gaa ctg ggc cat gca ctg ggc ttg gag cac tct aat gac    878  
Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Asn Asp  
255                    260                    265

ccc agt gct atc atg gct ccc ttc tac caa tac atg gag aca cac aac 926  
Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Thr His Asn

- 270 275 280

ttc aag cta ccg cag gac gat ctc cag ggc atc cag aag att tac gga 974  
Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln Gly Ile Gin Lys Ile Tyr Gly  
285 290 295 300

ccc cca gct gag cct ctg gag ccc aca agg ccc ctc cat aca ctc ccg 1022  
Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu His Thr Leu Pro  
305 310 315

gtc cgc agg atc cac tcg ccg tct gag agg aag cac gag cgg cac cca 1070  
Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg His Pro  
320 325 330

agg ccc cca cgg ccg ccc ctt ggg gac cgg cca tcc act cca ggt gcc 1118  
Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp Arg Pro Ser Thr Pro Gly Ala  
335 340 345

aaa ccc aac atc tgc gat ggc aac ttc aac aca gtg gcc ctc ttc cga 1166  
Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg  
350 355 360

ggg gag atg ttt gtg ttc aag gat cgc tgg ttc tgg cgc ctg cgc aat 1214  
Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn  
365 370 375 380

aac cgg gtg cag gaa ggc tac ccc atg cag atc gaa cag ttc tgg aag 1262  
Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys

385

390

395

ggc ctg ccc gcc cgc ata gac gca gcc tat gaa aga gct gac ggg aga 1310  
Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg  
400 405 410

ttc gtc ttc ttc aaa gga gac aag tac tgg gtt ttc aaa gaa gtg acg 1358  
Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr  
415 420 425

gtg gaa cct ggg tac ccc cac agc ttg ggg gag ctg gga agc tgc ctg 1406  
Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu  
430 435 440

ccc cgt gaa gga att gac aca gct ctg cgc tgg gaa cct gtg ggc aaa 1454  
Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys  
445 450 455 460

acc tac ttc ttc aaa ggc gaa cgg tac tgg cgc tac agc gag gag cgg 1502  
Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg  
465 470 475

cga gcc aca gac cct ggc tac ccc aag ccc atc acc gtg tgg aag ggc 1550  
Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly  
480 485 490

atc ccg cag gct ccg caa ggg gcc ttc atc agc aag gaa gga tat tac 1598

Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr

495

500

505

acc tac ttc tac aaa ggc egg gac tac tgg aag ttt gac aac cag aaa 1646

Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys

510

515

520

ctg agc gtg gag cca ggc tac cca cgc aac atc ctg cgt gac tgg atg 1694

Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met

525

530

535

540

ggc tgc aag cag aag gag gta gag cggt cgt aag gag cgg agg ctg ccc 1742

Gly Cys Lys Gln Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro

545

550

555

cag gat gat gtg gac atc atg gtg acc atc gat gac gtg cca ggc tct 1790

Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr Ile Asp Asp Val Pro Gly Ser

560

565

570

gtg aac gct gtg gct gtg gtt gtc ccc tgc aca ctg tcc ctc tgc ctc 1838

Val Asn Ala Val Ala Val Val Val Pro Cys Thr Leu Ser Leu Cys Leu

575

580

585

ctg gtg ctg ctc tac act atc ttc caa ttc aag aac aag gcg ggt cct 1886

Leu Val Leu Leu Tyr Thr Ile Phe Gln Phe Lys Asn Lys Ala Gly Pro

590

595

600

cag ccc gtc acc tac tat aag cgg ccg gtc cag gag tgg gta 1928

Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro Val Gln Glu Trp Val

605

610

615

tgagcagccc agagccctct ctgtctaccc ggctctggcca gccaggccct tcctcaccag 1988

ggtctgaggg gcagctctag ccactgccc ctggggccag cagggctaag gcagggttcg 2048

tgttagctg aagtgggtggg tgcactggtc taggctgagt gcggggctgg gagtgaatgtt 2108

ggctatgccc aggttggta gctggcaccc agctgccagc ctctgtcct gggcagacct 2168

ctctctactc aaggaaatag gccaggccct gtcaggagtc aaggatggtg ccaggaggtg 2228

ccccctgaggt cattgcatcc tgtggtgtct gcaagatacc acagctccag tcctggctgg 2288

gaccctagccc tctgaggcaa gccagcacta gctctcaccc caccccaaga tgccaccaat 2348

cccgagtcccc tctgccaaca cctgctggtc agatgtcccc tcatccctac cctactatcc 2408

tccaaggctg cagtgcctt gatgccaaca gagttgggcaa aagcctgggt ttccctgtct 2468

agcccataga gagattccctc aggaaacctg ttccacccgt caggtctcct ctgagactca 2528

gaacttaggg tcacatgttg caggcaaggc tggatctcac aaggacccag 2588

ctgtcatgtc gtgaatattt aaatgtccctg tcactactgt taaaagtccc attttgcaaa 2648

ggctacttga ggcttttaggt cagctagagg tgactgtctt ggtgtatgagg ccagtatgtt 2708

ggcccttccc cgggcactaa ggaccacggt gctgcaaagg ccactcgggc atcctgatac 2768

tagcgggcat cctgttcagg aggctcaaca gctacaggag ctgaccctgg ttctggggc 2828

ggatgcaagt tttgtgaccat tctctactcc ccctcattaa ttttgtcccc tgccctgtcc 2888

cagcctgtcc tctgtggcctt gggggctcggtt cctgactaca ggtaaagcag agaggattct 2948

agagccaccc ttgtcatctt ctcagagtaa gggaccaggg cagccttttta agttctccat 3008

ctacatcccc agtgaccctg aggcaactca gctccagcct ggagtcggtg tttgtgctcc 3068

tatcttgacc ctggcagccc aggtctctgg gtccatcttc ctgcacttgtt ctttaggaaaa 3128

gggtccctttt cccagctggta agcagccccaa ggctttgggg tttcccccaa ctccctaacc 3188

caaactacctt ttttgtttaacc ttgaggccctt ctgcacatct gacagttcc 3248

aagtcttggtt tttgtttaacc ttgaggccctt ctgcacatct gacagttcc 3308

ccaaacccaa cggtggtacg aggccggcat caaggtgcta gtgggtcaca gataccaact 3368

ctgacaccttg agcctgcatttggccctt ctgcctgttgcgtt ctgcactc 3428

gacagagact ctgcgttgcatttggccctt ctgcactc 3488

atgtgggtcc actgtgtccca atctcaccat ttttgttgcatttggccctt ccaaggcc 3548

gctccctggg gcaggcgccccaa aacaactgca gagattttgttgcatttggccctt ccaaggcc 3608

gttttatact ttgcaaagca ctttattagc tcacagctgt ccactcacat gaaactcccg 3668

taggcctctga gagaggctga gggtagcact catcttaccc tcagatgaag cacaaggagg 3728

tcttatttac tgccccctgcc atccaggtgg ccctggctgg gtcttgtgtc cccatcagtg 3788

ggccctttcca gggtccaaga aaactgtctc ttcctagtcctt ctccctctggg cctccctccc 3848

ccagtccttc ggtccctctc ctcaagggtgg tgctcaattc ttgaaagctc taggccccgc 3908

aggctccctg ttggctcctg gcattccaag gccagttgcg aaagagcagg ggatggaggc 3968

aggcagccca ggctgcagat gtgagggaca cagggccggg cccagagagg gtcagccta 4028

gaggctttcca atcttgatt cttctgcctg cggtcatctg ttgtccatc agcccaggtc 4088

agagcagtca gaggggcaaa gtactggagc ccccagagct cagttcccc tcggcctggg 4148

tgacatcaca gcatctcagt gtcggtcaca ttttaaactg atcagccctt gtacaatgtt 4208

ttttaaatca tttctaaata aaacagaaaat acagtgttaa aaaaaaaaaa aaaaa 4263

<210> 8

<211> 2620

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

&lt;222&gt; (1)..(1935)

&lt;400&gt; 8

atg ccg agg agc cgg ggc ggc cgc gcc gcg ccg ggg ccg ccg ccg 48  
Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Pro Pro Pro

1 5 10 15

ccg ccg ccg ccg ggc cag gcc ccg cgc tgg agc cgc tgg ccg gtc 96  
Pro Pro Pro Pro Gly Gln Ala Pro Arg Trp Ser Arg Trp Arg Val Pro

20 25 30

ggg cgg ctg ctg ctg ctg ctg ccc gcg ctc tgc tgc ctc ccg ggc 144  
Gly Arg Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Pro Gly

35 40 45

gcc gcg cgg gcg gcg gcg gcg ggg gca ggg aac cgg gca gcg 192  
Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Asn Arg Ala Ala

50 55 60

gtg gcg gtg gcg gtg gcg cgg gcg gac gag gcg gag gcg ccc ttc gcc 240  
Val Ala Val Ala Val Ala Arg Ala Asp Glu Ala Glu Ala Pro Phe Ala

65 70 75 80

ggg cag aac tgg tta aag tcc tat ggc tat ctg ctt ccc tat gac tca 288  
Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Asp Ser

85 90 95

cgg gca tct gcg ctg cac tca gcg aag gcc ttg cag tcg gca gtc tcc 336  
Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Ala Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser

100

105

110

act atg cag cag ttt tac ggg atc ccg gtc acc ggt gtg ttg gat cag 384  
Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln

115

120

125

aca acg atc gag tgg atg aag aaa ccc cga tgt ggt gtc cct gat cac 432  
Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His

130

135

140

ccc cac tta agc cgt agg cgg aga aac aag cgc tat gcc ctg act gga 480  
Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly  
145 150 155 160

cag aag tgg agg caa aaa cac atc acc tac agc att cac aac tat acc 528  
Gln Lys Trp Arg Gin Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr  
165 170 175

cca aaa gtg ggt gag cta gac acg cgg aaa gct att cgc cag gct ttc 576  
Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe  
180 185 190

gat gtg tgg cag aag gtg acc cca ctg acc ttt gaa gag gtg cca tac 624  
Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr  
195 200 205

cat gag atc aaa agt gac cgg aag gag gca gac atc atg atc ttt ttt 672  
His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe  
210 215 220

gct tct ggt ttc cat ggc gac agc tcc cca ttt gat gga gaa ggg gga 720  
Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly  
225 230 235 240

ttc ctg gcc cat gcc tac ttc cct ggc cca ggg att gga gga gac acc 768  
Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr  
245 250 255

cac ttt gac tcc gat gag cca tgg acg cta gga aac gcc aac cat gac 816  
His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp  
260 265 270

ggg aac gac ctc ttc ctg gtg gct gtg cat gag ctg ggc cac gcg ctg 864  
Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu  
275 280 285

gga ctg gag cac tcc agc gac ccc agc gcc atc atg gcg ccc ttc tac 912  
Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr  
290 295 300

cag tac atg gag acg cac aac ttc aag ctg ccc cag gac gat ctc cag 960  
Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln  
305 310 315 320

ggc atc cag aag atc tat gga ccc cca gcc gag cct ctg gag ccc aca 1008  
Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr  
325 330 335

agg cca ctc cct aca ctc ccc gtc cgc agg atc cac tca cca tcg gag 1056  
Arg Pro Leu Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu

340 345 350

agg aaa cac gag cgc cag ccc agg ccc cct cgg ccg ccc ctc ggg gac 1104  
Arg Lys His Glu Arg Gln Pro Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp  
355 360 365

cgg cca tcc aca cca ggc acc aaa ccc aac atc tgt gac ggc aac ttc 1152  
Arg Pro Ser Thr Pro Gly Thr Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe  
370 375 380

aac aca gtg gcc ctc ttc cgg ggc gag atg ttt gtc ttt aag gat cgc 1200  
Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg  
385 390 395 400

tgg ttc tgg cgt ctg cgc aat aac cga gtg cag gag ggc tac ccc atg 1248  
Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met  
405 410 415

cag atc gag cag ttc tgg aag ggc ctg cct gcc cgc atc gac gca gcc 1296  
Gin Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala  
420 425 430

tat gaa agg gcc gat ggg aga ttt gtc ttc ttc aaa ggt gac aag tat 1344  
Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr  
435 440 445

tgg gtg ttt aag gag gtg acg gtg gag cct ggg tac ccc cac agc ctg 1392

Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu

450

455

460

gag gag ctg ggc agc tgt ttg ccc cgt gaa ggc att gac aca gct ctg 1440

Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu

465

470

475

480

cgc tgg gaa cct gtg ggc aag acc tac ttt ttc aaa ggc gag cgg tac 1488

Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr

485

490

495

tgg cgc tac agc gag gag cgg cgg gcc acg gac cct ggc tac cct aag 1536

Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys

500

505

510

ccc atc acc gtg tgg aag ggc atc cca cag gct ccc caa gga gcc ttc 1584

Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe

515

520

525

atc agc aag gaa gga tat tac acc tat ttc tac aag ggc cgg gac tac 1632

Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr

530

535

540

tgg aag ttt gac aac cag aaa ctg agc gtg gag cca ggc tac ccg cgc 1680

Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg

545

550

555

560

aac atc ctg cgt gac tgg atg ggc tgc aac cag aag gag gtg gag cgg 1728

Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg

565

570

575

cgg aag gag cgg cgg ctg ccc cag gac gac gtg gac atc atg gtg acc 1776  
Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr

580

585

590

atc aac gat gtg ccg ggc tcc gtg aac gcc gtg gcc gtg gtc atc ccc 1824  
Ile Asn Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val Ala Val Val Ile Pro

595

600

605

tgc atc ctg tcc ctc tgc atc ctg gtg ctg gtc tac acc atc ttc cag 1872  
Cys Ile Leu Ser Leu Cys Ile Leu Val Val Val Tyr Thr Ile Phe Gln

610

615

620

ttc aag aac aag aca ggc cct cag cct gtc acc tac tat aag cgg cca 1920  
Phe Lys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro  
625 630 635 640

gtc cag gaa tgg gtg tgagcagccc agagccctctt ctatccactt ggtctggcca 1975  
Val Gln Glu Trp Val  
645

gccaggccc ttctcaccag ggtctgaggg gcagctctgg ccagtgctca ccagggccag 2035

cagggcccta ggctgggtc gtacagctga agttgtgggt gcattggcct aggctgagcg 2095

tggggcaggg aattatgggg gctgtgccc gggtgtgggt ctggcaccca gtcggcagcc 2155

ttctgtccctg ggcaaactac tccctactta aggaaatagg ccaggctcca tccggaggca 2215

gggaccatgc caggaggagc ccctgtggtc acggcatcct tggttgtccca tgaggtacca 2275

cagctccact cctggctgga acccgccacc ctctgtggga agccagcact agctctcata 2335

ccccatccgg gagataaccac cagtcttgggt ccccttttgc caacacctgc tggtcagatg 2395

tccccctacc cccacccac tgtcctccaa ggctacagga cccctgcttc tgacacagtg 2455

agcaacaagc ctgggtttcc ctgctggcag acggcagatc cctcaggaaa cctgctccac 2515

ttgtcagggt ctcttcggag acccaggatt taggttcaca tgctgcaggc agggctgtgg 2575

cccagctggg tctgacaagg acccgtgtca catcgtaat attta 2620

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ggttcccttt gttccacttg g 21

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10  
gtaggaaatc gggttttagg gaggtcgaca ttgcc 35

<210> 11  
<211> 23  
<212> D N A  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
ggcaatgtcg acctccctac aac 23

<210> 12  
<211> 22  
<212> D N A  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
ggagctgtct aaggccatca ca 22

<210> 13  
<211> 23  
<212> D N A  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
ctccctacaa cccgaattcc tac 23

<210> 14  
<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

c ttgtgggca gataggggc

20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

c g c g c c g a g g g a c c t c a g c c t g

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

g g t t c c t c t t g t t c c a c t t g

21

<210> 17

<211> 2295

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

a a g a g a c a a g a g g t g c c t t g t g g g c a g a t a g g g g c t t g g g a g g g g c c t g c c c g g a a g c a

60

gtggggcccc gtggcaggct tctcaactggg taggaccggg cccctgttg cacccctca 120

ccctgccttc tgccctcagg agtggctaag cagggtcggt tacctgeccc cggctgaccc 180

cacaacaggg cagctgcaga cgcaagagga gctgtctaag gccatcacag ccatgcagca 240

gtttggggc ctggaggcca ccggcattct ggacgaggcc accctggccc tggatgaaaac 300

cccacgctgc tccctgccag acctccctgt cctgacccag gctgcagga gacgccaggc 360

tccagccccc accaagtggaa acaagaggaa cctgtcggtgg aggggtccggaa cgttcccacg 420

ggactcacca ctggggcacg acacggtgcg tgcactcatg tactacgccc tcaaggctcg 480

gagcgacatt ggcggccctga acttccacga ggtggcgggc agcaccgccc acatccagat 540

cgacttctcc aaggccgacc ataacgacgg ctacccttc gacgcccggc ggcaccgtgc 600

ccacgccttc ttccccggcc accaccacac cgccgggtac acccacttta acgatgacga 660

ggcctggacc ttccgcctt cggatgcccc cgggatggac ctgtttgcag tggctgtcca 720

cgagtttggc cacgccatig ggttaagcca tggatggccct gcacactccca tcatgcggcc 780

gtactaccag ggcccgggtgg gtggaccgcgt ggcgtacggg ctccctacg aggacaaggt 840

gcgcgtctgg cagctgtacg gtgtgcggga gtcgtgtct cccacggcgc agcccgagga 900

gcctccccctg ctgccggagc ccccagacaa ccgggtccagc gccccgcca ggaaggacgt 960  
gccccacaga tgcagcac tc acitggacgc ggtggccag atccgggtg aagctttctt 1020  
cttcaaaggc aagtacttctt ggccggctgac gcgggaccgg cacctggtgtt ccctgcagcc 1080  
ggcacagatg caccgtttctt ggccggggctt gccgctgcac ctggacagcg tggacgcccgt 1140  
gtacgagcgc accagcgacc acaagatcg tttttttaaa ggagacaggt actgggtt 1200  
caaggacaat aacgttagagg aaggataccc gcgcggcgtc tccgacttca gcctccgccc 1260  
tggcggcatc gacgctgcct ttcctggc ccacaatgac aggacttatt tttaaggaa 1320  
ccagctgtac tggcgctacg atgaccacac gaggcacatg gacccggctt accccgccc 1380  
gagccccctg tggaggggtg tccccagcac gctggacgc gccatgcgtt ggtccgacgg 1440  
tgccctctac ttcttccgtt gccaggagta ctggaaagtg ctggatggcg agctggaggt 1500  
ggcacccggg tacccacagt ccacggcccg ggactggctg gtgtgtggag actcacagggc 1560  
cgatggatct gtggctgcgg gcgtggacgc ggcaaggggg ccccgccccc ctccaggaca 1620  
acatgaccag agccgctcg aggacggta cgaggctgc tcatgcacctt ctggggcatc 1680  
ctctcccccg ggggccccag gcccactggt ggctgccacc atgctgctgc tgctgccc 1740  
actgtcacca ggcgcctgtt ggacagcgcc ccaggccctg acgctatgac acacagcg 1800

agccccatgag aggacagagg cggtgccaca gcctggccac agagggcaag gactgtgccg 1860

gagtccttgg gggaggtgtc ggcgcgggat gaggacgggc caccctggca ccggaaaggcc 1920

agcagagggc acggcccggc agggctgggc aggctcagggt ggcaaggacg gagctgtccc 1980

ctagtgaggg actgtgttgta ctgacgagcc gaggggttgtc cgctccagaa gggtgcccg 2040

tcaggccgca ccggccgcccag cctccctccgg ccctggaggg agcatctcgg gctgggggcc 2100

caccctctc tgtgccggcg ccaccaaccc cacccacact gctgccttgt gctcccggc 2160

gccccacaggg cctccgtccc caggtccca gtggggcagc cctccccaca gacgagcccc 2220

ccacatggtg ccgcggcact tcccccttgt gacgcgttcc agaccaacat gacctctccc 2280

tgcttttgttag cggcc 2295

<210> 18

<211> 4014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (3148)..(3280)

<220>

<221> exon

<222> (3564)..(3633)

<400> 18

ttctgttggg gtgtccctgg caaactagga agtggttccc acccttcac tccagcccc 60

aagacggccc ctcccaggat gccttagcctg agatttgggg cacarccct gagcacaaac 120.

tctgtttagg taggaggcac ccaccagccc tgccccacag acccaccacc ccccaagatt 180

cgatgccatt ctatgctcaa attccagtgc ctccctgggc cacaggcgac agtgcctgtt 240

tatcatgggc ggggctgcct gtcccccggct ggtgccgggg ccctggttct atgagttgaa 300

gcaggctggc cgctcacacc tgcaactaaa ccacctgctt ccaaacaatg ggcaacatcc 360

cacagccact gggagtgtcg cctgccaggc ccggctccac tttcctgaaa tgcatgtggc 420

ctcgtggcca ggctgccccag ctccctgggg accagagtgg ggggtgcccc aaaccgcccc 480

cgtgaacccc acagagtaaa tgggccactc agtgcagcta ccagccatga cctcagctta 540

tagacgggaa ggctgggggg tgagttgtcc tcccaagggg tctcagcacc tgctggccca 600

acccaggcag cagctggct gggtggaaa ggcacctgcc tgtgtggacc ctccctgg 660

gagggggcag ggggtcatca tccaatatca tagatgtatgt gaggaaactc cagagtgtt 720

cctggaggag gtgacaggct attgttaacca tgaggcacag tggccctgtt gagctgtgat 780

c ttaacaaag gactaaaaag tgcagaatgt gctgatggc atctccagca cctacagcgg. 840

t gactgatca tgggacaccc tcagtaaacc ctgcagggtgc aaggtagtgtt gggacccggat 900

gctcgcccccc aaagatcccc acaccctgga ggtcagggcg gaagtgggag gccagcttgt 960

caaggccaag gctgtcaccc ccaaggcccc tccagagaag ctgcccaccc cagtcatgaa 1020

cgtccacttt gacgtcctgt cgtgcctata gctttggagg ggcccccagt tcgtacaca 1080

ctcttggctt ccccaagggg ctgaggggct gggctgggtc agtagggttt ggaaaggggg 1140

taaaggcaca gagggggggcc ccgggaagga ctca gtcgtcctt cctggaaggg gaatctcggt 1200

gtgtgcagat cccatgtagt gtcttgtgag gcccctcctg gccagcacgs cctgttgctg 1260

atgcccctgg gacttccagg atgggtggtgc ctcatccct ctgagcacgt cctgctgkgt 1320

gggcaggagg gttggccagg accaccccat caccagctcc tgcagaccag aacctggagg 1380

cccagcagggt ggcataawtg agtcacaagc atttctttt ttctttttcc tttttttttt 1440

tttaggattt cttaaaaag ttatgttttt ttcatttatg catttttta ggttaaggcca 1500

catgaaacta ctatgtatata ttttaaatca gaaatggtca aaaatggca ctttcataatg 1560

atttggccaa tgaatacatgt agagggtggta aataatagcg atttcacaagc attttctaaa 1620

tgtccaggga aaaaaaaaaag acagggttgtc aggccaggca gagccccag cacatcaccc 1680

ctggcttgtta cttttctgga gcccgcctca cccctgtgti ggttccctgg gctggcgagt 1740

atccacaggg cagagcagca gcttcatggc agcctgcaag tgggcacagg cgccatttgg 1800

cgggttgaaga aactgaagct agggggggag gttagccccca cagatggcac ccaggcctgc 1860

catccccagg tccccacgat ggcacccagg tccccacaga tggcatccag gccccctgt 1920

ccccaggggcc cctccagggt agcagagatg actggggcat ggggccagg ctgttattat 1980

gccccaggta aagggctgcc ctcattctgt ctcctactca gtcgggtgti gggtagcct 2040

gcacccaccc cagtgggccc ttcaagcagc agctgtcccc tgcgccagg tctgggtgtga 2100

acattttcca cgtcctggct cacgtctca tcaccagctt gccaaggact ctgaggaagg 2160

agcccagagg ggtggactgc cttgccccag gcacacagcg gggagggtggc tgagtggat 2220

ttgaacctag gcagcctggc tggaacctgg cttttgtttc tgagacagg tctcgctctg 2280

tgcagacac agtctgcaac tcctgtgtc aaacgatect cccgcctcag cctcccaaag 2340

tgctgggatc tcagggataa gccacacgac cggccaagcc tgggccttta tctccccat 2400

gaatgtatag catggcccaa ttccttaaac tggtgtctga gccacagct ttc.cagctg 2460

gggtccccaga ccttggatgc tagacttccc tgtcacaagt cagctgagag cctgcatttg 2520

acactggcca catttaagag ccttttgaag gttcccttagc attttgcgtt ctcaggaggc 2580  
gtggggtgtgg gcaggggtgc catgagtggt tgtacaggtc gtgcacggca caagctcaca 2640  
ccatctaagg gacatcatat ttattttattt attcatttt tagatggagt cttgtctgt 2700  
cgccccaggct ggagtgcagt ggcacgatct cggctcaactg caagctccgc ctccctgggtt 2760  
cccaccactc tcctgcyclca gcctcccgag tagctgggac tacaggcacc tgccaccaca 2820  
cccggtataat tttttgtatt ttttagtagag acgggggttc accatatttt ctaggatgg 2880  
ctccatctcc tgacctcatg atccgcctgc ctccggctcc caaactgctg ggattacagg 2940  
cgtgagccac agcacccggc cagggacatc aggtttatata agacactttt ccggcagctg 3000  
cccagggaaag agacagagag gtgccttggt ggcagatagg gggctgggag gggccctgcc 3060  
cggaagcagt gttggcccggt ggcaggcttc tcactgggtt ggaccgggcc ctctgttgtca 3120  
ccccctcacc ctgctctctg ccctcaggag tggcttaagca ggttcgggtt cctgcccccg 3180  
gbtgacccca caacaggcga gctgcagacg caagaggagc tgtcttaaggc catcacagcc 3240  
atgcagcagt ttkgtgtggct ggaggchacc ggcattctgg gtcagtttc cagggggcag 3300  
cgggagcgcgc gttggcccttc tcaggctgc gcccgtggc catgccccctt ctgatcaggc 3360

acagtccgt ctatgcttg aatgaacctg ggtccggcc tggtgttagct cagagccctgg 3420  
ggctggtccc ccaaagatga cgtgggagga gggsgcggtc cgaggactgg tgccagatc 3480  
aggctccgc ccttggggat gctcgggatc cttagggtggg gagtgagctg ggctaggctc 3540  
tgagctccat gcttccctg cagacgaggc caccttggcc ctgtataaaa cccccacgtc 3600  
ctccctgcca gacctccccct gtcctgaccm caggctctgc agggagacgc acaggctcm 3660  
cagcccccm mcaagtggac acagagagga acctgtcgta gaggtgggtg cttggccagg 3720  
gtgaggagcg gggcctccgt ggaggtggsc gcgtggccag ggtgaggaac ggggtctccg 3780  
tggagggtggg cgcgtggcca ggggtgggaa cggggctcc tcgtggaggcgg gtgcgtggcc 3840  
agggtgagga acagggtctc cgtggaggta ggcgcgtggc cagggtgggg aacgggtct 3900  
ccgtggaggc gggtgcgtag ccagggttag gagtggggcc cccatgtctc cgtgtctggg 3960  
cctgtgttag atatcaagct tatcgatacc gtcgacactcg agggggghcc gtac 4014

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

aatctcccat cggcccttcc a

21

<210> 20

<211> 20

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 20

atgcacggcc accaggaaga

20

<210> 21

<211> 20

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 21

ggatcagaca acgatcgagt

20

<210> 22

<211> 20

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 22

cagcttgaag ttgtgcgtct

20

<210> 23

<211> 17

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 1

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP, Xaa=N<sup>α</sup>-acetylproline

<400> 23

Xaa Val Thr Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys

1

5

10

15

Cys

<210> 24

<211> 19

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 1

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP, Xaa=N<sup>α</sup>-acetylhistidine

<400> 23

Xaa Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe

1

5

10

15

Ala Ser Cys

<210> 25

<211> 18

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 1

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP, Xaa=N<sup>a</sup>-acetylleucine

<400> 25

Xaa Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg

1

5

10

15

Gln Cys

<210> 26

<211> 17

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP

<400> 26

Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln

1

5

10

15

Asp

<210> 27

<211> 20

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP

<400> 27

Cys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro Val

1

5

10

15

Gln Glu Trp Val

20

<210> 28

<211> 8

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<223> FLAG epitope

<400> 28

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05350

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

 DDBJ/EMBL/GenBank/GeneSeq  
 Swissprot/PIR/GeneSeq  
 BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Cancer Research, Vol. 56 (1996), Xose S. Puente et al., "Molecular Cloning of a Novel Membrane-type Matrix Metalloproteinase from a Human Breast Carcinoma", pages 944-949	1-4, 9-16 5-8, 17-20
X A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 15 (1997), Shofuda K. et al., "Expression of Three Membrane-type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Rat Vascular Smooth Muscle Cells and Characterization of MT3-MMPs with and without Transmembrane Domain", Pages 9749-9754	5-12, 17-20 1-4, 13-16
X A	JP, 10-210982, A (Fuji Chemical Industries, Ltd.), 11 August, 1998 (11.08.98) (Family: none)	5-12, 17-20 1-4, 13-16
P, X P, A	EP, 875577, A2 (Smithkline Beecham Corporation), 04 November, 1998 (04.11.98) & US, 5837508, A & JP, 10-313878, A	5-12, 17-20 1-4, 13-16

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 21 December, 1999 (21.12.99)Date of mailing of the international search report  
 28 December, 1999 (28.12.99)Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05350

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No. 13 (Mar.1999), Duamqomg Pei et al., "Identification and Characterization of the Fifth Membrane-type Matrix Metalloproteinase MT5-MMP", pages 8925-8932	5-12,17-20 1-4,13-16
P,X P,A	Cancer Research, Vol. 59 (June 1999), Elena Liano et al., "Identification and Characterization of Human MT5-MMP, a New Membrane-bound Activator of Progelatinase A Overexpressed in Brain Tumors", pages 2570-2576	5-12,17-20 1-4,13-16

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05350

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims 1 to 20 have a matter in common of "an antibody recognizing a transmembrane matrix metalloprotease".

However "an antibody recognizing a transmembrane matrix metalloprotease" is not a novel one (there have been already known a plural number of transmembrane matrix metalloproteases). Therefore, it is not a special technical feature in the meaning as specified in the second sentence in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT, namely, a technical feature clearly indicating that the inventions as a whole contribute to the prior art.

Accordingly, there is no technical relevancy among the inventions relating to the antibodies recognizing the polypeptides comprising the sequences represented by SEQ ID NOS: 1 and 2 and 5 and 6. Such being the case, the inventions do not comply with the requirement of unity of invention.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**     The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/05350

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53, A61K39/395

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

DDBJ/EMBL/GenBank/GeneSeq

Swissprot/PIR/GeneSeq

BIOSIS/WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一覧の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Cancer Research Vol.56 (1996) Xose S. Puente et al. "Molecular Cloning of a Novel Membrane-type Matrix Metalloproteinase from a Human Breast Carcinoma" p. 944-949	1-4, 9-16 5-8, 17-20
X A	The Journal of Biological Chemistry Vol. 272 No. 15 (1997) Shofuda K. et al. "Expression of Three Membrane-type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Rat Vascular Smooth Muscle Cells and Characterization of MT3-MMPs with and without Transmembrane Domain" p. 9749-9754	5-12, 17-20 1-4, 13-16
X A	JP, 10-210982, A (富士薬品工業株式会社) 11.8月.1998 (11.08.98) (ファミリーなし)	5-12, 17-20 1-4, 13-16

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの。  
 「L」優先権主張に要義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願
- の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 21. 12. 99	国際調査報告の発送日 28.12.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 深草 亜子	4 B 9548

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/05350

C(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリーや*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	EP, 875577, A2 (Smithkline Beecham Corporation) 4.11月.1998 (04.11.98) & US, 5837508, A & JP, 10-313878, A	5-12, 17-20 1-4, 13-16
P, X P, A	The Journal of Biological Chemistry Vol. 274 No. 13 (Mar. 1999) Duanqomg Pei et al. "Identification and Characterization of the Fifth Membrane-type Matrix Metalloproteinase MT5-MMP" p. 8925-8932	5-12, 17-20 1-4, 13-16
P, X P, A	Cancer Research Vol. 59 (June 1999) Elena Liano et al. "Identification and Characterization of Human MT5-MMP, a New Membrane-bound Activator of Progelatinase A Overexpressed in Brain Tumors" p. 2570-2576	5-12, 17-20 1-4, 13-16

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、從属請求の範囲であつてPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1-20に係るそれぞれの発明に共通の事項は、「膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドを認識する抗体」である。  
しかし「膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドを認識する抗体」は新規ではないから（既に複数の膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドが知られている）、これはPCT規則13.2の第2文の意味において、特別な技術的特徴、すなわち各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を示す技術的特徴でない。  
したがって、配列番号1-2, 5-6で示される配列からなるポリペプチドを認識する抗体に係るそれぞれの発明の間にPCT規則13.2の意味における技術的な関係はなく、発明の単一性の要件は満たされていない。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

**This Page Blank (uspto)**